

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: 09124509 A

(43) Date of publication of application: 13.05.97

(51) Int. Cl

A61K 39/395
C07K 14/47
C07K 16/18

(21) Application number: 07303491

(22) Date of filing: 27.10.95

(71) Applicant: **SUMITOMO ELECTRIC IND LTD**

(72) Inventor:
KIYONO KENICHIRO
KAYAGAKI NOBUHIKO
YAKIDA HIDEO
OKUMURA YASUSHI
NAKADA MOTOMI

(54) THERAPEUTIC AGENT FOR HEPATITIS

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a therapeutic agent effective for treating hepatitis developing by death of hepatocyte by apoptosis, comprising an antibody against human Fas ligand or its active fragment as an active ingredient.

SOLUTION: This therapeutic agent for hepatitis comprises preferably 0.5-70wt% of an antibody against human Fas ligand or its active fragment as an active ingredient. The dose of the objective therapeutic agent is preferably 0.01-600mg based on the active ingredient per human adult daily. A monoclonal antibody to be specifically reacted with Fas ligand is preferable as the antibody against a human Fas ligand. A monoclonal antibody produced from hybridoma NOKI (FERM BP-5044), for example, may be cited as the monoclonal antibody. When the monoclonal antibody is made into a

human type or a chimera type monoclonal antibody, preferably the monoclonal antibody suppresses formation of an antibody against an adventitious protein and effectively acts.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

BEST AVAILABLE COPY

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-124509

(43)公開日 平成9年(1997)5月13日

(51)Int.Cl.⁶
A 6 1 K 39/395
C 0 7 K 14/47
16/18

識別記号
ACS
Z N A

序内整理番号

F I
A 6 1 K 39/395
C 0 7 K 14/47
16/18

技術表示箇所
A C S N
Z N A

審査請求 未請求 請求項の数10 FD (全 18 頁)

(21)出願番号 特願平7-303491

(22)出願日 平成7年(1995)10月27日

(71)出願人 000002130

住友電気工業株式会社
大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号

(72)発明者 清野 研一郎

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72)発明者 横垣 伸彦

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72)発明者 八木田 秀雄

東京都文京区本郷2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(74)代理人 弁理士 西川 繁明

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 肝炎治療剤

(57)【要約】

【課題】 肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的な肝炎治療剤を提供すること。

【解決手段】 ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤。また、該抗体の超可変領域、可変領域を少なくとも含む肝炎治療剤。

PTO 2002-4891
S.T.I.C. Translations Branch

【特許請求の範囲】

【請求項1】ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤。

【請求項2】ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントである請求項1記載の肝炎治療剤。

【請求項3】Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制する請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項4】血中のGOT及びGTPの値を改善することにより、肝臓の機能を改善する請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項5】ヒトのFasリガンドに対する抗体の活性フラグメントが、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体からなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項6】ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及びFERM BP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体である請求項2記載の肝炎治療剤。

【請求項7】ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖及び/またはL鎖の可変領域を含むキメラ抗体分子である請求項1記載の肝炎治療剤。

【請求項8】キメラ抗体分子が、人体適用化キメラ抗体(ヒト型化抗体)である請求項7記載の肝炎治療剤。

【請求項9】キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及びFERM BP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体のそれぞれの超可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請求項7記載の肝炎治療剤。

【請求項10】キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044、FERM BP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及びFERM BP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから産生されるモノクローナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請

求項7記載の肝炎治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、肝炎の治療剤に関し、さらに詳しくは、ヒトのFasリガンド(以下、FasLと略記することがある)に対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤に関する。本発明の肝炎治療剤は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的である。

【0002】

【従来の技術】多細胞生物は、その恒常性を保つため、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり、プログラム細胞死(programmed cell death)とよばれている。これに対して、物理的または化学的原因によって引き起こされる死は、不慮の死(conditional cell death)とよばれ、プログラム細胞死と区別されている。

【0003】これら2つの死は、その過程が異なっている。プログラム細胞死では、細胞容積の縮小、核網状構造の消失と凝縮、細胞表面の微絨毛の消失及び水泡形成、そして、それらに続くアポトーシス小体(apoptotic body)の形成などの形態学的な特徴によって定義されるアポトーシスの過程を経て細胞が死ぬと考えられている。アポトーシスでは、殆どの場合、染色体DNAの断片化反応を伴う。これに対して、不慮の死では、細胞や核が膨潤し、破壊するネクローシスの過程を経て死ぬと考えられている。

【0004】ところが、抗癌剤や放射線による細胞死、ウイルス感染による細胞死、あるいは細胞障害性リンパ細胞による標的細胞の死などは、決してプログラム細胞死であるとは考えられないにもかかわらず、アポトーシスの過程を経ることが分かってきた。このことから、現在では、アポトーシスとプログラム細胞死は、必ずしも同一ではないと考えられるに至り、両者は、区別されるようになっている。

【0005】アポトーシスを誘導する要因または物質として、現在、多くのものが知られている。Fas(Fas抗原)は、アポトーシスを媒介する細胞表面タンパク質として知られている。Fasは、細胞に死のシグナルを伝える細胞表面タンパク質として単離されたもので、TNF/NGF受容体ファミリーに属する分子量45KdaのI型細胞膜貫通型タンパク質である。TNF/NGF受容体ファミリーのメンバーは、その殆どがそれぞれ特異的なリガンドに対する受容体であると考えられている。Fasも、アポトーシスのシグナルを媒介するリ

ガンドに対する受容体と考えられている。Fasを発現している細胞は、FasがそのリガンドであるFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入り、死にいたる。

【0006】Fasリガンドは、Fasの生理的リガンドであり、分子量40Kdaの細胞表面タンパク質である。Fasリガンドは、その構造から、TNFファミリーであることが分かっている。Fasリガンドは、Fasを発現している細胞にアポトーシスを誘導する活性を有している。FasとFasリガンドの系（すなわち、Fasシステム）は、アポトーシスに関して、現在までに最も研究が進展している分野であり、多くの研究報告がなされている。例えば、Fasがアポトーシスのスイッチの役割を果たすことは、米原らの抗Fas抗体の作製に関する論文（J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989年）にまでさかのぼることができる。その後、Fas遺伝子のクローニングにより、Fasの構造が明らかにされている（Cell vol. 66, p. 233-243, 1991年）。さらに、エイズ原因ウイルスHIV感染T細胞に、Fasが発現していること（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年）、抗Fas抗体（Jo-2抗体）をマウスに投与すれば、マウスは劇症肝炎に似た現象を起こして死ぬこと（Nature vol. 364, P806-809, 1993年）等が報告されている。この他にも種々の研究報告がなされ、これらについては実験医学vol. 11, No. 17, 1993年の「アポトーシス-細胞死の構造-」羊土社版、及び実験医学vol. 13, No. 16, 1995年の「アポトーシス研究の最前線-シグナル伝達構造から疾患まで」羊土社版に詳しくまとめられている。

【0007】肝臓に関しては、前述の抗Fas抗体（Jo-2抗体）投与によるマウスの劇症肝炎発症以外にも、種々の報告がなされている。これらの報告内容は、実験医学vol. 13, No. 16, p. 200-204, 1995年に、「肝炎とアポトーシス」と題する論文としてまとめられている。この文献によれば、肝炎に関し、以下のようなことが判明している。

(1) 慢性肝炎において、活動性の指標となるpiecemeal necrosis（削りとり壊死）は、門脈域周囲で認められるが、この領域で起こる細胞死の全体がネクローシスではなくてアポトーシスである。

(2) ウィルス性肝炎における細胞障害機序については、細胞性免疫が重要な役割をもっている。ウィルス抗原が感染肝細胞内でプロセスされた後、HLAクラスIによって肝細胞表面に提示され、これをCTLが認識し傷害する。

(3) 肝炎ウィルスによる肝細胞障害に、Fasシステムを介したアポトーシスが関与している可能性が考えら

れる。すなわち、肝浸潤リンパ球がFasリガンドを発現し、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導するという可能性である。

【0008】(4) 抗Fas抗体（マウスモノクローナル抗体、IgM分画）を用いた免疫組織学的な手法により、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現についての検討が行われた結果、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現と肝炎の活動性が相関することが分かった。

10 (5) C型慢性肝炎において、肝内に浸潤している単核球は、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導可能なFasリガンドを表出していることを意味し、肝細胞障害機序にFasシステムを介したアポトーシスが関与することを示唆するものである。このように、ウィルス性肝炎では、B型及びC型を問わずFas抗原が高発現していることが分かる。しかしながら、Fasリガンド誘導の機序については、細胞内のシグナルなど不明な点も多く、今後の研究課題として残されているのが現状である。

20 【0009】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的な肝炎治療剤を提供することにある。前述したように、肝臓における劇症肝炎やウィルス性肝炎では、その発症において、FasとFasリガンドの系（Fasシステム）が何らかの形で関与しているのではないかと考え、本発明者たちは、Fasリガンドに対する抗体を用いて鋭意検討を行った結果、in vitroの実験系において、Fasリガンドが肝細胞に障害を与えること、さらには、この障害は、抗Fasリガンド抗体により阻止できることを見出した。

30 また、Fasリガンドに対する抗体が肝炎の発症を抑制することができるという新規な知見を得た。そして、この抗体を有効成分とする製剤が、ウィルス性肝炎などの肝疾患に対する治療薬（抗肝炎剤）として有用であることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】本発明によれば、ヒトの40 Fasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤が提供される。また、本発明によれば、以下のような好ましい実施態様が提供される。

1. ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントである前記の肝炎治療剤。

2. Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制する前記の肝炎治療剤。

3. 血中のGOT及びGTPの値を改善することにより、肝臓の機能を改善する前記の肝炎治療剤。

【0011】4. ヒトのFasリガンドに対する抗体の活性フラグメントが、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体からなる群より選ばれる少なくとも1種である前記の肝炎治療剤。

5. ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044、FERMBP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及びFERM BP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから產生されるモノクローナル抗体である前記の肝炎治療剤。

6. 前記モノクローナル抗体の超可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

7. 前記モノクローナル抗体の可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明の肝炎治療剤の有効成分として使用されるFasリガンドに対する抗体（すなわち、抗FasL抗体）は、細胞表面分子であるFasリガンド、及びマトリックスマタロプロテアーゼにより分解されて細胞培養上清液や生体の体液中に存在する可溶性Fasリガンド（sFasL）を認識する抗体である。Fasリガンドに対する抗体としては、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が好ましい。さらには、FasリガンドとFasとの結合を阻害することができる抗体がより好ましい。このようなモノクローナル抗体は、例えば、次のような方法により得ることができる。

【0013】(1) 動物（例、マウスなどの齧歯類動物）を、Fasリガンドを発現させたCOS細胞で免疫感作する。ただし、動物としては、Fasの機能を欠損したものを選ぶ。

(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてもよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤（例、ポリエチレンギリコール）の存在下で混合して両細胞を融合する。電気的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なもの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

【0014】(4) 融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別

する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択倍地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地（すなわち、ヒポキサンチン-アミノブテリン-チミジン培地）を用いる。

(5) ハイブリドーマを含有する培養上清液分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

【0015】(6) 所望の抗体を分泌している細胞が存在する培養ウェル中の細胞群をクローニングする。クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローンを選択する。

(8) 再度クローニングを行って、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローンを樹立する。

20 (9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

【0016】本発明の肝炎治療剤の有効成分として使用するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044（ハイブリドーマNOK1）、FERM BP-5045（ハイブリドーマNOK2）、FERM BP-5046（ハイブリドーマNOK3）、FERMBP-5047（ハイブリドーマNOK4）、及びFERM BP-5048（ハイブリドーマNOK5）として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体（NOK1～5）を挙げることができる。

【0017】ヒトのFasリガンドに対する抗体は、免疫グロブリンである。ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体は、均一な免疫グロブリンであり、例えば、IgMのクラスに属し、L鎖がκ鎖であるもの、IgG₂のサブクラスに属し、L鎖がκ

40 であるもの、IgG₁のサブクラスに属し、L鎖がκ鎖であるもの、IgG₃のサブクラスに属し、L鎖がκ鎖であるものなどが存在する。

【0018】Fasリガンドに対する抗体の活性フラグメントは、抗Fasリガンド抗体の有する抗原抗体反応活性を有する免疫グロブリンのフラグメントを意味する。このような活性フラグメントとしては、具体的には、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体などがある。これらの活性フラグメントは、免疫グロブリン（抗FasL抗体）から常法により調製することができる。例えば、F(ab')₂フラグメン

トは、免疫グロブリンIgGをペプシンを用いて消化することにより得ることができる。Fab'フラグメントは、Fab(a'b')₂、フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化することにより得ることができる。Fabのフラグメントは、IgGをペパイン消化することにより得ることができる。Fvフラグメントは、H鎖可変部(V_H)とL鎖可変部(V_L)を非共役結合で結合して得られる。組換えFv体は、例えば、モノクローナル抗体を產生するハイブリドーマから抗体のH鎖及びL鎖の可変部にあたる遺伝子についてDNAをシーケンスして、H鎖可変部(V_H)とL鎖可変部(V_L)をコードする塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、V_H-Linker-V_L構造を有する一価の抗体活性フラグメントを大腸菌や動物細胞等の細胞に產生させることにより得ることができる。

【0019】本発明の実施例で使用したSCIDマウスは、ヒトの細胞を移植することができる動物として有名である。このSCIDマウスは、1983年にBosmaにより、成熟したリンパ球(T細胞及びB細胞)を全くもたない免疫不全ミュータントマウスとして発見されたマウスである(Nature, vol. 301, p. 527-530, 1983)。このマウスは、ヒトの重症複合免疫不全症(SCID)と同様の病態を呈する。このSCIDマウスにヒトの自己免疫疾患症である原発性胆汁性肝硬変症SLE、自己免疫性甲状腺炎等の患者のリンパ球やリンパ組織を移入し、病象の再現を試みる動きがある。これらは、J. Exp. Med., vol. 170, p. 1919-1930, 1989、J. Exp. Med., vol. 172, p. 985-988, 1990、Clin. Exp. Immunol., vol. 84, p. 34-37, 1991年などに記載されている。また、同じような試みがScience, vol. 241, p. 1632-1639, 1988年に報告されている。

【0020】本発明者は、SCIDマウスの腹腔内にヒトの末梢血単核細胞(PBMC)を投与し、投与後、6時間ないし12時間後に、D-ガラクトサミン20mg/マウスとSEB(Staphylococcal enterotoxin B)10μg/マウスを同じく腹腔内に投与することで、肝炎を引き起こすことに成功した。この系は、Fasを発現しているSCIDマウスにヒトのPBMCを入れ、このマウスにDガラクトサミンとSEB刺激することで、導入したヒトPBMC中のT細胞が活性化し、細胞の表面にFasリガンドを発現するとともに、マウスの腹腔内及び体液中に可溶性のFasリガンドが分泌されることで、Fasを発現しているマウス肝細胞がFasリガンドを介して、アポトーシスで死滅し、その結果として、肝炎が発症するという系である。

【0021】本発明の肝炎治療剤は、Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制することにより、肝炎を治療するものと推定される。より詳細には、Fasを発現している肝細胞は、FasがFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入るが、本発明の肝炎治療剤は、このような反応を抑制することにより肝炎を治療するものと推定される。また、本発明の肝炎治療剤は、肝機能を改善し、血中のGOT(グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)及びGPT(グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ)の値を改善することができる。具体的には、本発明の肝炎治療剤は、血中のGOT及びGPTの濃度を正常値に回復させることができる。

【0022】本発明で使用するFasリガンドに対するモノクローナル抗体(抗FasL抗体)またはその活性フラグメントの肝炎治療剤としてヒトに作用させる場合、HAMA等の外来蛋白質に対する抗体の生成を抑えて効果的に作用させるためには、該抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することが効果的である。これらに関する技術は、すでに公知の文献あるいは特許公報に記載されており、抗体產生ハイブリドーマさえあれば、容易に実施することができる。特許公報では、EP-A-0120694、EP-0125023、EP-0171496、EP-A-0173494、WO86101533等があり、一般文献としては、Nature, Vol. 322, p. 323-327(1988)、Nature, vol. 321, p. 522-525(1986)、Nature, vol. 328, p. 731-734(1987)等が挙げられる。これらに開示されている公知技術に基づいて、抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することができる。

【0023】ヒト型化あるいはキメラ型化するに際し、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044(ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045(ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046(ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047(ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048(ハイブリドーマNOK5)として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体(NOK1~5)の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含ませることが好ましい。

【0024】このようなモノクローナル抗体NOK1~5のH鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列及びその塩基配列は、本発明者らが見いだしたものであり、配列表に記載する。

(1) ハイブリドーマNOK1が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号1で表

されるアミノ酸配列の30番目のSerから34番目のAsn、49番目のArgから65番目のGly、及び93番目のTyrから109番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号3で表されるアミノ酸配列の24番目のArgから34番目のAsn、50番目のTyrから56番目のSer、及び89番目のGlnから97番目のThrである。

【0025】(2)ハイブリドーマNOK2が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号5で表されるアミノ酸配列の30番目のAsnから34番目のGly、49番目のTyrから65番目のGly、及び93番目のTyrから107番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号7で表されるアミノ酸配列の24番目のLysから39番目のGly、55番目のLeuから61番目のSer、及び95番目のGlnから102番目のThrである。

【0026】(3)ハイブリドーマNOK3が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号9で表されるアミノ酸配列の30番目のSerから34番目のAsn、49番目のArgから65番目のGly、及び93番目のTyrから105番目のValである。

【0027】(4)ハイブリドーマNOK4が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号11で表されるアミノ酸配列の32番目のTyrから35番目のAsn、50番目のTyrから65番目のAsn、及び93番目のTyrから107番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号13で表されるアミノ酸配列の24番目のArgから38番目のHis、54番目のArgから60番目のSer、及び93番目のGlnから101番目のThrである。

【0028】(5)ハイブリドーマNOK5が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号15で表されるアミノ酸配列の30番目のThrから34番目のHis、49番目のTyrから65番目のAsp、及び93番目のTyrから106番目のTyrであり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号17で表されるアミノ酸配列の24番目のLysから34番目のAla、50番目のTyrから56番目のThr、及び89番目のGlnから97番目のThrである。

【0029】(6)ハイブリドーマNOK1が產生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号1で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号2の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号3で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号4の塩基配列である。

【0030】(7)ハイブリドーマNOK2が產生する

モノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号5で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号6の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号7で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号8の塩基配列である。

【0031】(8)ハイブリドーマNOK3が產生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号9で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号10の塩基配列である。

10 【0032】(9)ハイブリドーマNOK4が產生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号11で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号12の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号13で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号14の塩基配列である。

【0033】(10)ハイブリドーマNOK5が產生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号15で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号16の塩基配列である。また、L鎖の可変領域

20 20 は、配列番号17で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号18の塩基配列である。

【0034】本発明の肝炎治療剤の剤形としては、活性な有効成分を含む通常の医薬または医薬組成物と同様に、例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、坐薬、噴霧剤、クリーム剤、パップ剤、点眼剤等を挙げることができる。例えば、注射剤であれば、当該抗体を含む溶液を無菌状態で調製し、必要があれば、マンニトール等の安定化剤、賦形剤等を補助成分として添加してもよい。これをアンプル、バイアル等に充填し、そのまま使用する

30 30 こともできるし、必要に応じて、凍結乾燥等を行うことも可能である。本発明の肝炎治療剤は、乾燥品の場合は、注射用蒸留水等に溶解して投与することができる。投与方法は、経口投与、静脈注射、吸入、経皮投与、点眼、局所投与、皮下投与等から適切な方法を選んで投与すればよい。本発明の肝炎の治療剤は、Fabリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として、通常、0.1～100重量%、好ましくは0.5～70重量%の割合で含有するものである。本発明の肝炎治療剤の投与量は、有効成分を基準として、ヒト成人

40 40 1日あたり、通常、0.001～1000mg、好ましくは0.01～600mgである。もちろん、上記投与量は、一応の目安であり、患者の年齢、性別、体重、さらには疾患の種類とその程度に応じた投与量を適宜選択すればよい。

【0035】

【実施例】以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0036】【実施例1】

(1) マウス肝細胞の調製

50 マウス肝細胞は、三井等編「機能細胞の分離と培養」

(昭和62年1月30日丸善株式会社発行) 第178~179頁に記載されているコラゲナーゼ灌流法を準用して分離した。すなわち、

麻酔後、マウスを手術台に乗せ、手術用ハサミで皮膚、腹筋の順に開腹した。よくしぼったアルコール脱脂綿で腸を術者の右側にかきよけ、門脈を十分露出させた。

門脈に縫合糸のループをかけ眼科用ハサミの先端を使って門脈に切れ目を入れた。切開部から溢れ出る血液をカニューレ先端から滴下する前灌流用緩衝液で洗い流しながら、すばやく門脈の切開面からカニューレを挿入し、縫合糸で結紮した。同時に、肝臓下の下大静脈 (subhepatic inferior vena cava) を切断し、洗浄液を放出させた。そのまま30 ml/minの流速でペリスタポンプを作動させ、37℃に保温した前灌流用緩衝液を灌流し続けた。

【0037】次に、胸廓部を開き、心臓を露出させた。横隔膜下の下大静脈 (thoracic inferior vena cava) に縫合糸のループをかけた後、右心房を眼科用ハサミで切開して別のカニューレを右心房から下大静脈に挿入し結紮した。こうして、灌流液は、肝臓を循環し横隔膜下の下大静脈を流れ、新しく挿入したカニューレを経由して、恒温槽内の瓶に戻り循環した。この状態で4~5分間灌流を続け、スムーズに灌流することを確かめた上でポンプを止め、循環液をコラゲナーゼ溶液 (約100 ml) に交換し再び灌流を始めた。8~10分間コラゲナーゼ溶液の灌流を続けると、肝臓は次第に消化され、肝小葉が浮き上がったような外観を呈し、表面から酵素液が滲出してきた。この状態で灌流を中止し、肝臓各葉をスパーテルで受けつつ、ハサミで切り離しシャーレに移した。約10 mlのMEM (ニッスイ社製) 液を加え、手術用メスで軽く細分すると、消化された肝細胞がとろけるように分散した。次いで、30 ml MEMを加え、先太の駒込ピペットで軽く2~3回ピッティングし、さらに細胞を分散させた後、2~3枚のガーゼを重ねた細胞濾過器で濾過した。

【0038】このようにして、まず、粗分散肝細胞浮遊液を調製した。次いで、この中からさらに肝実質細胞のみをとりだすために、以下の操作を行った。細胞浮遊液を50 ml細胞遠心管に集め、卓上冷却遠心機で低速遠心 (50 × g, 1 min) した。この遠心条件では、肝実質細胞は、他の細胞に比し大きいので遠心管の底にパックされ、非実質細胞、損傷細胞、赤血球、細胞破片等は、沈殿しないで上清中に残る。上清を静かに駒込ピペットで除き、新たに細胞洗浄用緩衝液を加え、細胞を先太の駒込ピペットで軽く懸濁した後、同時に低速遠心した。この操作を3~4回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得ることができた。低速遠心操作後、得られた肝実質細胞の viability は、通常90%

以上 (トリパン青の染色試験) で、その収量は4~6 × 10⁷細胞/g肝臓である。こうして得られたマウス肝細胞に対し、Fasリガンドを導入したトランスフェクタントL5178Y-FasLの培養上清中に含まれる可溶性Fasリガンド (すなわち、sFasL) の細胞障害を検討した。

【0039】(2) L5178Y-FasLの調製

ヒトFasリガンドをL5178Yに導入する方法は、以下の通りである。すなわち、PMK1t Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子1 μgに対し、XhoIとNotI (ベーリンガー社製) の制限酵素を各1

10 単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロース電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850 pbのバンドを切り出した。このアガロースゲルから、GENCLEAN IIキット (BIO101、フナコシ社製) を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスミルク (glass milk) を加え5分間ローテートして、DNAを吸着させた。このグラスミルクをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10 μlに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、BCMG S_{neo}のベクター1 μgについても同様にXhoIとNotIで制限酵素処理を行い、0.75%アガロースゲル電気泳動を行った後、GENCLEAN IIキットを用いて精製した。

【0040】次に、FasリガンドとDNAとBCMG S_{neo}のベクターのライゲーションをベクター:cDNA

30 A=1:2 (モル比) になるように混合し、宝酒造社製DNAライゲーションキットを用いて、16℃で16時間反応させて、ライゲーションした。この反応液を、大腸菌コンピテントセル (東洋紡社製) と混合して、氷上で30分間、42℃で40秒間インキュベートすることにより、DNAを大腸菌へ導入した。これに対し、SOC培地を加え、37℃で1時間振盪培養後、アンピシリソ入のLB寒天培地に分注し37℃にて1日間培養した。その後、出現したコロニーをLB培地で37℃で1日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド (ヒトFasリガンド-BCMG S_{neo}) を回収した。

【0041】このヒトFasリガンド-BCMG S_{neo}

1 μgについて、L5178Y細胞1 × 10⁶個に対し、エレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー (バイオラッド社製) を用い、296V、960 μFで実施した。この細胞を再度10%FCS-RPMI1640培地5 mlに懸濁した。6 wellプレートに、この細胞の液を入れて培養を行ったが、この時、G418 (GIBCO社製) を0.4 mg/mlになるように培地に添加した。10日間の培養後、コロニーが得られたので、限界希釈法によ

り、細胞をクローニングした。得られたクローンについて、ノーザンハイブリダイゼーション法によりヒトFasリガンドのmRNAの濃度が一番高いものにを選別し、培養した。これをFasリガンド-L5178Y細胞(すなわち、L5178Y-FasL)とした。

【0042】(3) マウス肝細胞に対するFasLの細胞障害性の検討

可溶性FasL(sFasL)の調製

L5178Y-FasLを75cm²の培養フラスコを用いて5×10⁶個/mlの濃度で10%FCS・RPMI1640培地30mlで4日間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清(sFasL)は、0.45μmのフィルターで滅菌し、保存した。

ターゲット細胞の調製

細胞は、(1)で調製した肝実質細胞を10%FCS・L-15培地にて2×10⁶個/mlに調製した。

【0043】アッセイ

で調製したsFasL分子を10%FCS・RPMI1640培地で12倍に希釈した。96ウェル平底プレート(コーニング社製)を用い、各ウェルにこの希釈液25μl加えた。次いで、10%FCS・L-15培地を25μl加えた。また、比較対象として、抗マウスFas抗体(Jo-2:ファーミンジョン社製)を10μg/mlの濃度で25μl加えたもの、さらにはTNF(シグマ社製)を10μg/mlで25μl加えたものを用いた。このプレートの各ウェルに50μlで調製したターゲットを入れた。その後、37℃、5%CO₂の環境下のもとで12時間インキュベートした。次いで、アラマーブル(A la mar blue™、コスモバイオ社製)を10μl加え、さらに37℃、5%CO₂下にて4時間反応させた。その後、フルオロスキャンII(タイターテック社製)を用いて蛍光量を測定した。その結果をまとめたものを表1に示す。表1から明らかなように、肝実質細胞は、sFasLに対してのみviability(生存率)が低下した。

【0044】

【表1】

添加剤	生存率(%)
未添加	100
sFasL	0.5
抗Fas抗体	99
TNF	98

【0045】(4) マウス肝細胞に対するFasLの細胞障害における抗ヒトFasL抗体の効果

前述のごとく、FasLは、肝実質細胞に対し、細胞障害性を示すことが分かったので、次に、この細胞障害反応が抗ヒトFasL抗体で阻害できるかどうかについて検討を加えた。すなわち、(3)と同様の系において実施した。前記(3)で調製したsFasLを10%

FCS・RPMI1640培地で12倍に希釈した。96ウェル平底プレートを用い、各ウェルにこの希釈液を25μl加えた。次いで、10%FCS・L15培地にて10μg/mlに希釈した抗ヒトFasL抗体(NOK1)を25μl加え、37℃、5%CO₂下にて1時間インキュベートした。次に、肝実質細胞2×10⁶個/mlを50μl/ウェル加えた。37℃、5%CO₂下にて12時間インキュベートした。次いで、アラマーブル(A la mar blue™、コスモバイオ社製)を10μl加え、さらに37℃、5%CO₂下にて4時間インキュベートした。その後、フルオロスキャンIIを用いて、生細胞が分解した色素の蛍光強度を測定した。その結果を表2に示す。表2から明らかなように、抗FasL抗体の添加により肝細胞のアポトーシスは抑制された。

【0046】

【表2】

添加剤	生存率(%)
未添加	100
sFasL	0.5
sFasL+抗FasL抗体	99

すなわち、*in vitro*の実験系では、FasLを介した肝細胞のアポトーシスを、抗FasL抗体が抑制できることができた。

【0047】(5) SCIDマウスにおける実験的肝炎モデル系における抗FasL抗体投与による肝炎の抑制の検討

SCIDマウス(8週齢のメス、チャルーズリバー社製)1匹あたり、ヒトの末梢血単核細胞(PBMC)を5×10⁷個を1mlのPBSに懸濁したものを腹腔内に投与した。次いで、6時間ないし12時間後にD-ガラクトサミン(ワコー社製)20mgとSEB(Staphylococcal enterotoxin B)(シグマ社製)10μgをPBS1mlに懸濁したものをさらに腹腔内に投与した。なお、抗FasL抗体を投与する場合は、D-ガラクトサミン、SEB投与30分前に、500μgを腹腔投与した。その後、12時間後における血中のGOT(グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ)及びGPT(グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ)の濃度を測定するとともに、24時間後の肝細胞の染色を行った。その結果、抗FasL抗体投与群は、24時間後に、コントロールの非投与群に比べ、有意に生存が認められた。また、12時間後のGOTとGPTの量は、コントロールに比べて2桁違いの値となり、正常に近いほどに回復しているのが認められた。結果を表3に示す。

【0048】

【表3】

15

抗FasL抗体	生存数	GOT	GPT
+	4/4	350	210
-	0/4	>10000	>10000

この結果、本発明のヒトのFasリガンドに対する抗体の投与は、肝炎の治療剤として有効であることが実証できた。

【0049】参考例1】抗FasL抗体のV領域遺伝子シーケンス

ハイブリドーマNOK 1～5を用いて、下記のプロトコールによりFasリガンドに対するモノクローナル抗体の可変領域（V領域）の遺伝子シーケンスを行った。

1. cDNAの調製

(1) ハイブリドーマNOK 1～5のそれぞれを25cm²フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、PBSで遠心洗浄した後、1mlのPBSに懸濁し、細胞数を数えた。細胞1×10⁶個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜き取り、ペレットをタッピングした。

(2) RNAzol B（コスマバイオ製）を200μl加え、ピペットマンのチップでよく攪拌して細胞を溶かした。クロロホルムを20μl添加し、振盪後、氷中に5分間放置した。4℃で15,000 rpm、15分間遠心した後、上層の無色透明の部分を回収し、新しいチュ

* 16

* ーブに移した。4℃で15,000 rpm、15分間遠心した後、上清を捨てて、ペレットに75%エタノールを800μl加え、-20℃で30分間放置した。4℃で15,000 rpm、15分間遠心した後、ペレットに蒸留水11.5μl添加した。

(3) オリゴdT (0.5 mg/ml) を0.5μl添加して、70℃で10分間、氷上で5分間放置した。

【0050】

【表4】

10	5xRT buffer	4μl
	10mM dNTPmix	1μl
	Superscript RTase	1μl

(Stratagene製)

を加え、42℃で50分間、90℃で5分間、氷上で5分間放置した。

(4) RNase Hを1μl添加し、37℃で20分間放置した。このようにして、cDNA混合物を調製した。

20 【0051】2. PCR反応

(1) 前記で得られたcDNAを用い、下記の条件でPCR反応を行った。

【0052】

【表5】

	VH	VL
cDNA	2μl	2μl
dNTPmix	1μl	1μl
primer	2μl	1μl
(Pharmacia製)		
10xPCR buffer	4μl	4μl
DDW	30.5μl	31.5μl
Ampli-Tag	0.5μl	0.5μl

【0053】ミネラルオイル40μlを重層し、94℃で5分間放置した後、「55℃で2分間、72℃で3分間、94℃で1分間」のサイクルを30サイクル行い、次いで、55℃で2分間、72℃で10分間放置した。

(2) 反応液4μlをミニゲル電気泳動（1.5%アガロースゲル）でチェックした。結果を図1に示す。モノクローナル抗体NOK 3のL鎖を除いて、PCRによりDNA断片が増幅したことが確認された。

【0054】3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動（1.5%アガロースゲル）させて、VH（H鎖V領域）及びVL（L鎖V領域）のバンドをゲルから切り出した。

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動（1.5%アガロースゲル）でバンド

※をチェックした。例として、NOK 4のVHについての結果を図2に示す。

【0055】4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応（Ligation）を行った。

40

【0056】

【表6】

ADDW	5μl
10xLigation buffer	1μl
PCRベクター	2μl
PCR生成物	1μl
T4DNA Ligas	1μl

14℃で一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

※50

【0057】5. トランスフォーメイション

TAクローニングキットを用いて形質転換 (Transformation)を行った。

(1) 氷上で細胞 $50\mu\text{l}$ に、 0.5M の β メルカプトエタノール $2\mu\text{l}$ 、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し30分間放置した後、 42°C の湯浴中に30秒間、次いで、氷上に20分間放置した。 $450\mu\text{m}$ のSOC培地を加え、 37°C で1時間 (225 rpm) インキュベートした。

(2) 次いで、LB agarプレート (+Amp, X-Gal, IPTG) に拡散した。各サンプルは、 $50\mu\text{l}$ 、 $100\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ であった。 37°C で18時間インキュベートした後、 4°C で2時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

【0058】6. ミニ培養 (Mini Culture)

(1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを4個ずつ拾った。

(2) $3\text{m}\text{l}$ のLB培地 (+Amp) に1個のコロニーを加え、 37°C で一晩振盪した。

【0059】7. ミニ調製 (Mini Preparation)

(1) 培養溶液 $1.5\text{m}\text{l}$ をエッペンドルフチューブに取った。(保存用としてLBプレートに拡散して 37°C で培養した。) 4°C で $6,000\text{rpm}$ 、2分間遠心した。

(2) ppt. + $100\mu\text{l}$ 溶液1 (リゾチーム $5\text{mg}/\text{m}\text{l}$) を加え、室温で5分間放置した後、 $200\mu\text{l}$ の溶液2 (氷上で穏やかに5分間混合) を添加し、 $150\mu\text{l}$ の溶液3 (氷上で15分間混合) を添加し、次いで、 4°C で $12,000\text{rpm}$ 、5分間遠心した。

(3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で $12,000\text{rpm}$ 、1分間遠心した。

【0060】(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のCHCl₃:iAA (9:1) 混合物を加え、室温で $12,000\text{rpm}$ 、1分間遠心した。

(5) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、 $1\mu\text{l}$ のMusse1グリコーゲンと $900\mu\text{l}$ のエタノールを添加し、 -80°C で30分間放置した後、 4°C で $15,000\text{rpm}$ 、5分間遠心した。

(6) 沈殿物を乾燥した。 $20\mu\text{l}$ のTE及び $1\mu\text{l}$ のRNase A ($5\text{mg}/\text{m}\text{l}$) を加え、 65°C で20分間放置した。

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser

1

5

10

15

Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp

20

25

30

* (7) このようにして、プラスミドDNAを得た、

(8) 下記の条件でミニゲル電気泳動を行い、バンドをチェックした。NOK4V_u、NOK5V_u、NOK5V_lの結果を図3に示す。

【0061】

【表7】

	H Bu f.	$1\mu\text{l}$
	E c o R I	$1\mu\text{l}$ (IU)
	D NA	$1\mu\text{l}$
10	ADDW	$7\mu\text{l}$

37°C で1時間インキュベートした後、 0.75% アガロースゲルに加えて電気泳動を行った。

【0062】8. DNAシーケンス

(1) プラスミドDNAを $1\mu\text{l}$ とり、 $99\mu\text{l}$ のTEにて希釈した。

(2) A260を測定し、DNA値を計算した ($A260 \text{ of } 1.0 = 50\mu\text{g}/\text{m}\text{l}$)。

(3) A260値より、DNAが $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTEにて希釈した。

(4) Dyeターミネーター法により、DNAシーケンス (ABIモデル373A) を行った。

【0063】9. V領域の解析

このようにして得られたDNAシーケンスをもとに、V領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図4 (モノクローナル抗体NOK1~5のVH領域のアミノ酸配列)、及び図5 (モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のVL領域のアミノ酸配列) に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、超可変領域 (CDR1~3) である。

【0064】

【発明の効果】以上説明したように、本発明の肝炎治療剤は、肝炎治療に有用である。とりわけ、本発明の肝炎治療剤は、肝実質細胞がアポトーシスにより死ぬことにより発症する肝炎に有効となる。その理由は、本発明の肝炎治療剤は、FasLとFasを介した肝実質細胞のアポトーシスを抑制するからである。

【0065】

【配列表】

40 配列番号 : 1

配列の長さ : 120

配列の型 : アミノ酸

トポロジー : 直鎖状

配列の種類 : ペプチド

*

19

20

Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly		
35	40	45
Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe Lys		
50	55	60
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met		
65	70	75
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala		
85	90	95
Arg Ser Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln		
100	105	110
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
115	120	

【0066】配列番号：2

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：360

起源

配列の型：核酸

マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

* 特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
ATG AAC TGG GTG AAG CAG AGG CCT GGA AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
CGA ATT TAT CCT GGA GAT GGA GAT ACT AAC GAC AAC GGG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACC GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTC AGC AGT CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
AGA TCG TAT TAC TAC GAT GGT AGC CCC TGG TTT ACT TAC TGG GGC CAA	336
GGG ACC ACG GTC ACC GTC TCC TCA	360

【0067】配列番号：3

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：108

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr			
20	25	30	
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Glu Phe Pro Trp			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg			
100	105		

【0068】配列番号：4

★ 配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：324

起源

配列の型：核酸

マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

★ 特徴を決定した方法：E

配列

50

21

GAC ATC CAG ATG ACG CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCC TCT CTG GGA	48
GAC AGA GTC ACC ATC AGT TGC AGG GCA AGT CAG GAT ATT AGC AAT TAT	96
TTA AAC TGG TAT CAG CAG AAA CCA GAT GGA ACT GTT AAA CTC CTG ATC	144
TAC TAC ACA TCA AGA TTA CAC TCA GGA GTC CCA TCA AGG TTC AGT GGC	192
AGT GGG TCT GGG ACA GAT TAT TCT CTC ACC ATC AGC AAC CTG GAA CCT	240
GAA GAT ATT GCC ACT TAC TTT TGT CAG CAA TAT AGT GAA TTT CCG TGG	288
ACG TTC GGT GGA GGC ACC AAG CTG GAA ATC AAA CGG	324

【0069】配列番号：5

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

* 10

配列

Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser	
1 5 10 15	
Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp	
20 25 30	
Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly	
35 40 45	
Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys	
50 55 60	
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met	
65 70 75 80	
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
Thr Val Thr Val Ser Ser	
115	

【0070】配列番号：6

※配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：354

起源

配列の型：核酸

30 マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

※ 特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG CAG TCA GGA GCT GAG CTG GTC AGG CCT GGG ACT TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT GCT GGA TAC ACC TTC ACT AAC TAC TGG	96
ATA GGT TGG GTA AAG CAG AGG CCT GGA CAT GGC CTT GAG TGG ATT GGA	144
TAT CTT TAC CCT GGA GGT CTT TAT ACT AAC TAC AAT GAG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC ACA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAG CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCC ATC TAT TAC TGT GCA	288
AGA TAC AGG GAT TAC GAC TAT GCT ATG GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

【0071】配列番号：7

★ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：113

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

★

配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile Gly	
1 5 10 15	
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn Ser	
20 25 30	
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser	

23	40	45
35	55	60
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro		
50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Ser		
85	90	95
Asn Tyr Leu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	110
Arg		

* 配列の種類: cDNA to mRNA

起源

マウス

配列の特徴:

特徴を決定した方法: E

*

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA CTC TCT CTG CCT GTC AAT ATT GGA	48
GAT CAA GCC TCT ATC TCT TGC AAG TCT ACT AAG AGC CTT CTG AAT AGT	96
GAT GGA TTC ACT TAT TTG GGC TGG TGC CTG CAG AAG CCA GGC CAG TCT	144
CCA CAG CTC CTA ATA TAT TTG GTT TCT AAT CGA TTT TCT GGA GTT CCA	192
GAC AGG TTC AGT GGT AGT GGG TCA GGG ACA GAT TTC ACC CTC AAG ATC	240
AGC AGA GTG GAG GCT GAG GAT TTG GGA GTT TAT TAT TGC TTC CAG AGT	288
AAC TAT CTT CCT CTT ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAA ATA AAA	336
CGG	339

【0072】配列番号: 8

※ トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 339

配列の種類: ペプチド

配列の型: 核酸

※

配列

Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser	15
1 5 10 15	
Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Trp	30
20 25 30	
Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly	45
35 40 45	
Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe Lys	60
50 55 60	
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met	80
65 70 75 80	
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala	95
85 90 95	
Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val	110
100 105 110	
Thr Val Ser Ser	
115	

【0073】配列番号: 9

★ トポロジー: 直鎖状

配列の長さ: 116

配列の種類: cDNA to mRNA

配列の型: 核酸

起源

鎖の数: 二本鎖

★ 50 マウス

配列の特徴：

* * 特徴を決定した方法：E

配列

GTG AAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GAG CTG GTG AAG CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAT GCA TTC AGT AGC TCC TGG	96
ATG AAC TGG GTG AAA CAG AGG CCT GGG AAG GGT CTT GAG TGG ATT GGA	144
CGG ATT TAT CCT GTA AAT GGA GAT ACT AAC TAC AAT GGG AAG TTC AAG	192
GGC AAG GCC ACA CTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTC AGC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCG GTC TAC TTC TGT GCA	288
ACC GAT GGT TAC TGG TAC TTC GAT GTC TGG GGC CAA GGG ACC ACG GTC	336
ACC GTC TCC TCA	348

【0075】配列番号：11

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：118

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln Ser	
1 5 10 15	
Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr	
20 25 30	
Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp Met	
35 40 45	
Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu Lys	
50 55 60	
Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe Leu	
65 70 75 80	
Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala	
85 90 95	
Val Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	
100 105 110	
Thr Val Thr Val Ser Ser	
115	

【0076】配列番号：12

★配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：354

起源

配列の型：核酸

マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

★ 特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGA CCT GGC CTC GTG AAA CCT TCT CAG TCT	48
CTG TCT CTC ACC TGC TCT GTC ACT GGC TAC TCC ATC ACC AGT GGT TAT	96
TAC TGG AAC TGG ATC CGG CAG TTT CCA GGA AAC AAA CTG GAA TGG ATG	144
GGC TAC ATA AGC TAC GAT GGT AGC AAT AAC TAC AAC CCA TCT CTC AAA	192
AAT CGA ATC TCC ATC ACT CGT GAC ACA TCT AAG AAC CAG TTT TTC CTG	240
AAG TTG AAT TCT GTG ACT ACT GAG GAC ACA GCC ACA TAT TAC TGT GCC	288
GTT TAT TAC TAC GAT GGT AGC TCT TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC	336
ACG GTC ACC GTC TCC TCA	354

【0077】配列番号：13

☆ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：112

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

☆

配列

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg	
1 5 10 15	

27

28

Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Gly	Val	Asp	Ser	Tyr
20															
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Pro	Pro
35															
Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Tyr	Leu	Lys	Ser	Gly	Val	Pro	Ala
50															
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Arg	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asp
65															
Pro	Val	Glu	Ala	Asp	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn
85															
Glu	Asp	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg
100															

【0078】配列番号：14

* 配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：336

起源

配列の型：核酸

マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

* 特徴を決定した方法：E

配列

GAC	ATT	GTG	CTG	ACC	CAA	TCT	CCA	GCT	TCT	TTG	GCT	GTG	TCT	CTA	AGG	48
CAG	AGG	GCC	ACC	ATA	TCC	TGC	AGA	GCC	AGT	GAA	GGT	GTT	GAT	AGT	TAT	96
GGC	ATT	AGT	TTT	ATG	CAC	TGG	TAC	CAG	CAG	AAA	CCA	GGA	CAG	CCA	CCC	144
AAA	CTC	CTC	ATC	TAT	CGT	GCA	TCC	TAC	CTA	AAA	TCT	GGG	GTC	CCT	GCC	192
AGG	TTC	AGT	GGT	AGT	GGG	TCT	AGG	ACA	GAC	TTC	ACC	CTC	ACC	ATT	GAT	240
CCT	GTG	GAG	GCT	GAT	GAT	GCT	GCA	ACC	TAT	TAC	TGT	CAG	CAA	AAT	AAT	288
GAG	GAT	CCG	TGG	ACG	TTC	GGT	GGA	GGC	ACC	AAG	CTG	GAA	ATC	AAA	CGG	336

【0079】配列番号：15

※ トポロジー：直鎖状

配列の長さ：117

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

※

配列

Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Ala	Glu	Pro	Ala	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	1
1																10
Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Tyr	Trp	20
																25
Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile	Gly	35
																45
Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Glu	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe	Lys	50
																55
Asp	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	65
																75
Gln	Leu	Ile	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	85
																95
Arg	Arg	Gly	Asn	Tyr	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr		100
																105
Val	Thr	Val	Ser	Ser												115

【0080】配列番号：16

★配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：351

起源

配列の型：核酸

マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

★50 特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT GGG GCT GAA CCG GCA AAA CCT GGG GCC TCA	48
GTG AAG ATG TCC TGC AAG GCT TCT GGC TAC ACC TTT ACT ACC TAC TAC TGG	96
ATG CAC TGG GTA AAA CAG AGG CCT GGA CAG GGT CTG GAA TGG ATT GGA	144
TAC ATT AAT CCT AGC AGT GGT TAT ACT GAG TAC AAT CAG AAG TTC AAG	192
GAC AAG GCC ACA TTG ACT GCA GAC AAA TCC TCC AGC ACA GCC TAC ATG	240
CAA CTA ATC AGC CTG ACA TCT GAG GAC TCT GCA GTC TAT TAC TGT GCA	288
AGA AGG GGT AAT TAC TAC TAC TTT GAC TAC TGG GGC CAA GGG ACC ACG	336
GTC ACC GTC TCC TCA	351

【0081】配列番号：17

* トポロジー：直鎖状

配列の長さ：105

配列の種類：ペプチド

配列の型：アミノ酸

*

配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser Ala Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn Asn			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Val			
65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr			
85	90	95	
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu			
100	105		

【0082】配列番号：18

※配列の種類：cDNA to mRNA

配列の長さ：315

起源

配列の型：核酸

30 マウス

鎖の数：二本鎖

配列の特徴：

トポロジー：直鎖状

※ 特徴を決定した方法：E

配列

GAT GTT TTG ATG ACC CAA ACT CCA AAA TTC CTG CCT GTC TCA GCA GGA	48
GAC AGG GTT ACC ATG ACC TGC AAG GCC AGT CAG AGT GTG GGT AAT AAT	96
GTG GCC TGG TAC CAA CAG AAG CCA GGA CAG TCT CCT AAA CTG CTG ATA	144
TAC TAT ACA TCC AAT CGC TAC ACT GGA GTC CCT GAT CGC TTC ACT GGC	192
AGT GGA TCT GGG ACA GAT TTC ACT TTC ACC ATC AGC AGT GTG CAG GTT	240
GAA GAC CTG GCA GTT TAT TTC TGT CAG CAG CAT TAT AGC TCT CCG TAT	288
ACG TTC GGA TCG GGG ACC AAG CTG GAG	315

★図である。

【図面の簡単な説明】

【図4】図4は、モノクローナル抗体NOK1～5のVH領域（H鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR1～3）である。

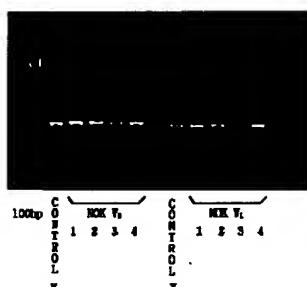
【図1】図1は、抗FabL抗体のVHの遺伝子及びVLの遺伝子のPCR反応液のミニゲル電気泳動図である。

【図5】図5は、モノクローナル抗体NOK1、2、4、5のVL領域（L鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR1～3）である。

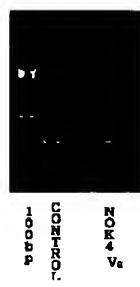
【図2】図2は、NOK4のVHの遺伝子のPCR生成物のミニゲル電気泳動図である。

【図3】図3は、プラスミドDNAのミニゲル電気泳動 ★

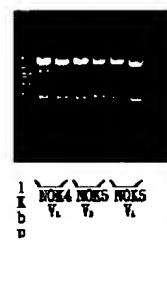
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

		CDR1	CDR2	
NOK1VH . amino	1:VQLQESGPVELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWWKQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTN		58
NOK2VH . amino	1:VQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF	TNYWIGWWKQRPGHGLEWIGLYLYPGLYTN		58
NOK3VH . amino	1:VKLQESGPVELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWWKQRPGKGLEWIGRIYPVNGDTN		58
NOK4VH . amino	1:VQLQESGPGLVKPSQSLSLTCVGTGYSITSGYYW	WIRQFPGNKLEWMG-YISYDGGSNN		58
NOK5VH . amino	1:VQLQESGAEPAKPGASVKMSCKASGYTF	TTYWMIWWKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTE		58
	***	***	***	

CDR3

NOK1VH . amino	59:DNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSYYYDGSPW-FTYWGQGTTVT	117
NOK2VH . amino	59:YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARYRDYD-YAMDY-WGQGTTVT	115
NOK3VH . amino	59:YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCA-T---DGY-WYFDWVGQGTTVT	113
NOK4VH . amino	59:YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCA-VYYYDG-SSF DYWGQGTTVT	115
NOK5VH . amino	59:YNQKFKD KATLTADKSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARRGNY--YYFDY-WGQGTTVT	114
	**	*****

NOK1VH . amino	118:VSS	120
NOK2VH . amino	116:VSS	118
NOK3VH . amino	114:VSS	116
NOK4VH . amino	116:VSS	118
NOK5VH . amino	115:VSS	117

[図 5]

		CDR1	CDR2	
NOK1VL . amino	1:DIQMTQSPSSLSASLGDRVТИСRASQDИSNY-----LNWYQQKPDGTVKLLIИYTSRLH			55
NOK2VL . amino	1:DVLMTQTPPLSLPVN1GДQASИСQKSTKSLLNSDГFTYLWCLQKPGQSPQLLIИYLVSNRF			60
NOK4VL . amino	1:DIVLTQSPASLAVSLRQRATИСRASEGVDSY-GISFMWYQQKPGQPPKLLIИYRASYLK			59
NOK5VL . amino	1:DVLMTQTPKFLPVSAGDRVТMTQKASQS-V-G-NNVAWYQQKPGQSPKLLIИYTSNRY			55
	* * * * *	*	* *** **** *	
		CDR3		
NOK1VL . amino	56:SGVPSRFSGSGSGTDYSLT1SNLEPEDIATYFC-QQYSEFPWTFGGGTKLEIKR			108
NOK2VL . amino	61:SGVPDRFSGSGSGTDFTLK1SRVAEДLGVYYCФQSNY-LPLTFGSGTKLEIKR			113
NOK4VL . amino	60:SGVPARFSGSGSRTDFTLT1DPVEADDAATYYC-QQNNEDPWTFGGGTKLEIKR			112
NOK5VL . amino	56:TGVPDRFTGSGSGTDFTFT1SSVQVEDLAVYFC-QQHYSSPYTFGSGTKLE---			105
	*** *** **** * *	* * * * *	* *** ****	

フロントページの続き

(72) 発明者 奥村 康
東京都文京区本郷 2-1-1 順天堂大学
医学部免疫学講座内

(72) 発明者 中田 元巳
神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電
気工業株式会社横浜製作所内

MACHINE-ASSISTED TRANSLATION (MAT):

(19)【発行国】
日本国特許庁 (JP)

(19)[ISSUINGCOUNTRY]
Japanese Patent Office (JP)

(12)【公報種別】
公開特許公報 (A)

Laid-open (Kokai) patent application number (A)

(11)【公開番号】
特開平9-124509

(11)[UNEXAMINEDPATENTNUMBER]
Unexamined-Japanese-Patent 9-124509

(43)【公開日】
平成9年(1997)5月13日

(43)[DATEOFFIRSTPUBLICATION]
May 13th, Heisei 9 (1997)

(54)【発明の名称】
肝炎治療剤

(54)[TITLE]
Hepatitis therapeutic agent

(51)【国際特許分類第6版】
A61K 39/395 ACS
C07K 14/47
16/18 ZNA

(51)[IPC]
A61K39/395 ACS
C07K14/4716/18 ZNA

【F I】
A61K 39/395 ACS N
C07K 14/47
16/18 ZNA

[FI]
A61K39/395 ACSN
C07K14/4716/18 ZNA

【審査請求】 未請求

[EXAMINATIONREQUEST] UNREQUESTED

【請求項の数】 10

[NUMBEROFCLAIMS] Ten

【出願形態】 FD

[Application form] FD

【全頁数】 18

[NUMBEROFPAGES] 18

(21)【出願番号】
特願平7-303491

(21)[APPLICATIONNUMBER]
Japanese-Patent-Application-No. 7-303491

(22)【出願日】
平成7年(1995)10月2

(22)[DATEOFFILING]
October 27th, Heisei 7 (1995)

7日

(71)【出願人】

(71)[PATENTEE/ASSIGNEE]

【識別番号】

0 0 0 0 0 2 1 3 0

[IDCODE]

000002130

【氏名又は名称】

住友電気工業株式会社

Sumitomo Electric Industries, Ltd.

【住所又は居所】

大阪府大阪市中央区北浜四丁目
5番33号

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 清野 研一郎

Kenichiro Seino

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 梶垣 伸彦

Nobuhiko Kayagaki

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 八木田 秀雄

Hideo Yagita

【住所又は居所】

東京都文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部免疫学講座内

[ADDRESS]

(72)【発明者】

(72)[INVENTOR]

【氏名】 奥村 康 Ko Okumura

【住所又は居所】 東京都文京区本郷 2-1-1
順天堂大学医学部免疫学講座内

(72) 【発明者】 (72)[INVENTOR]

【氏名】 中田 元巳 Motomi Nakata

【住所又は居所】 神奈川県横浜市栄区田谷町1番
地 住友電気工業株式会社横浜
製作所内

(74) 【代理人】 (74)[PATENTAGENT]

【弁理士】 [PATENTATTORNEY]

【氏名又は名称】 西川 繁明 Shigeaki Nishikawa

(57) 【要約】 (57)[SUMMARY]

【課題】 肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的な肝炎治療剤を提供すること。

[SUBJECT]

Provide a hepatitis remedy especially effective for the treatment of the hepatitis which originates and develops the hepatocyte by apoptosis dies.

【解決手段】 ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤。また、該抗体の超可変領域、可変領域を少なくとも含む肝炎治療剤。

[SOLUTION]

The hepatitis therapeutic agent which contains a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment as an active ingredient.

Moreover, the hepatitis therapeutic agent which contains at least the hypervariable region of this antibody, and a variable region.

【特許請求の範囲】 [CLAIMS]

【請求項 1】

ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤。

【請求項 2】

ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体またはその活性フラグメントである請求項1記載の肝炎治療剤。

【請求項 3】

Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制する請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項 4】

血中のGOT及びGTPの値を改善することにより、肝臓の機能を改善する請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項 5】

ヒトのFasリガンドに対する抗体の活性フラグメントが、F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体からなる群より選ばれる少なくとも1種である請求項1または2記載の肝炎治療剤。

【請求項 6】

ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体

[CLAIM 1]

The hepatitis therapeutic agent which contains a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment as an active ingredient.

[CLAIM 2]

The hepatitis therapeutic agent of Claim 1 which is the monoclonal antibody to which a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to this Fas ligand specifically, or its active fragment.

[CLAIM 3]

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 which suppress apoptosis of the liver caused when Fas ligand connects into the cell of the liver which is expressing Fas.

[CLAIM 4]

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 which improve the function of a liver by improving the blood value of GOT and GTP.

[CLAIM 5]

The hepatitis therapeutic agent of Claims 1 or 2 whose active fragments of the antibody with respect to a human's Fas ligand are at least one kind chosen out of the group consisting of F(ab')₂, Fab', Fab and Fv, and recombinant Fv body.

[CLAIM 6]

The hepatitis remedy of Claim 2 which is the monoclonal antibody by which the monoclonal antibody which reacts to a human's Fas ligand

が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4、 F E R M B P - 5 0 4 5、 F E R M B P - 5 0 4 6、 F E R M B P - 5 0 4 7、及び F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから產生されるモノクローナル抗体である請求項2記載の肝炎治療剤。

【請求項 7】

ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体のH鎖及び／またはL鎖の可変領域を含むキメラ抗体分子である請求項1記載の肝炎治療剤。

【請求項 8】

キメラ抗体分子が、人体適用化キメラ抗体（ヒト型化抗体）である請求項7記載の肝炎治療剤。

【請求項 9】

キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4、 F E R M B P - 5 0 4 5、 F E R M B P - 5 0 4 6、 F E R M B P - 5 0 4 7、及び F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから產生されるモノクローナル抗体のそれぞれの超可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請求項7記載の

specifically is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

[CLAIM 7]

The hepatitis therapeutic agent of Claim 1 which is a chimera antibody molecule containing the variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody to which a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to a human's Fas ligand specifically, and/or L chain.

[CLAIM 8]

The hepatitis therapeutic agent of Claim 7 whose chimera antibody molecule is a human-body application-ized chimera antibody (human-type-ized antibody).

[CLAIM 9]

The hepatitis remedy of Claim 7 which is that which contains at least the amino acid sequence of each hypervariable region of the monoclonal antibody by which a chimera antibody molecule is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

肝炎治療剤。

【請求項 10】

キメラ抗体分子が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4、F E R M B P - 5 0 4 5、F E R M B P - 5 0 4 6、F E R M B P - 5 0 4 7、及び F E R M B P - 5 0 4 8として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから產生されるモノクーナル抗体の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含むものである請求項 7 記載の肝炎治療剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、肝炎の治療剤に関し、さらに詳しくは、ヒトの Fas リガンド（以下、FasL と略記することがある）に対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤に関する。本発明の肝炎治療剤は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的である。

【0002】

【従来の技術】

多細胞生物は、その恒常性を保つため、細胞の増殖と死を巧妙にコントロールしている。個体

【CLAIM 10】

The hepatitis remedy of Claim 7 which is that which contains at least the amino acid sequence of the variable region of the monoclonal antibody by which a chimera antibody molecule is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERM BP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

【DETAILED DESCRIPTION OF INVENTION】

【0001】

【TECHNICAL FIELD】

This invention relates to the hepatitis remedy specifically which contains a human's antibody with respect to Fas ligand (it may abbreviate as FasL hereafter) or its active fragment as an active ingredient, about the remedy of a hepatitis.

The hepatitis therapeutic agent of this invention is effective for in particular the treatment of the hepatitis which is originated and developed by the hepatic cell by apoptosis of a hepatitis dies.

【0002】

【PRIOR ART】

The multicellular organism has controlled propagation and the death of a cell skillfully, in order to maintain the homeostasis.

発生の過程では、多くの細胞が細胞死によって除去される。成体においても、臓器を構成する細胞は、常に増殖と死のバランスを保ちながら、その機能を維持している。このような細胞死は、予め予定された死であり、プログラム細胞死 (programmed cell death) とよばれている。これに対して、物理的または化学的因素によって引き起こされる死は、不慮の死 (accidental cell death) とよばれ、プログラム細胞死と区別されている。

【0003】

これら2つの死は、その過程が異なっている。プログラム細胞死では、細胞容積の縮小、核網状構造の消失と凝縮、細胞表面の微絨毛の消失及び水泡形成、そして、それらに続くアポトーシス小体 (apoptotic body) の形成などの形態学的な特徴によって定義されるアポトーシスの過程を経て細胞が死ぬと考えられている。アポトーシスでは、殆どの場合、染色体DNAの断片化反応を伴う。これに対して、不慮の死では、細胞や核が膨潤し、破壊するネクローシスの過程を経て死ぬと考えられている。

【0004】

ところが、抗癌剤や放射線による細胞死、ウイルス感染による細胞死、あるいは細胞障害性リンパ細胞による標的細胞の死などは、決してプログラム細胞死

In an organism generating process, a cell death removes many cell.

Also in an adult creature, the cell which comprises an organ is maintaining its function, always maintaining propagation and the balance of death.

Such a cell death is death planned previously.

It is called the program cell death (programmed cell death).

On the other hand, it is called physical or death (accidental cell death) unexpected in the death caused by the chemical factor, and it distinguishes with the program cell death.

[0003]

As for the death of these two, the process differs.

It is considered that a cell dies of a program cell death through the process of the apoptosis which the morphological characteristics, such as reduction of a cell volume, a loss of a nucleus network structure, condensation and a loss of the microvillus on the surface of a cell, the blister formation, and the formation of the apoptosis corpuscle (apoptotic body) which follows them, define.

In almost all cases, fragmentation reaction of chromosome DNA is accompanied in apoptosis. On the other hand, a cell and a nucleus swell in unexpected death.

It is considered that it dies through the process of necrosis to destroy.

[0004]

However, nevertheless, the cell death by the anticancer agent or the radiant flux, the cell death by virus infection, or the death of the target cell by the cytotoxic lymph cell, which is never considered to be a program cell death, understands that goes through the process of

であるとは考えられないにもかかわらず、アポトーシスの過程を経ることが分かってきた。このことから、現在では、アポトーシスとプログラム細胞死は、必ずしも同一ではないと考えられるに至り、両者は、区別されるようになっている。

【0005】

アポトーシスを誘導する要因または物質として、現在、多くのものが知られている。Fas (Fas 抗原) は、アポトーシスを媒介する細胞表面タンパク質として知られている。Fas は、細胞に死のシグナルを伝える細胞表面タンパク質として単離されたもので、TNF/NGF 受容体ファミリーに属する分子量 45 Kda の I 型細胞膜貫通型タンパク質である。TNF/NGF 受容体ファミリーのメンバーは、その殆どがそれぞれ特異的なリガンドに対する受容体であると考えられている。Fas も、アポトーシスのシグナルを媒介するリガンドに対する受容体と考えられている。Fas を発現している細胞は、Fas がそのリガンドである Fas リガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入り、死にいたる。

【0006】

Fas リガンドは、Fas の生理的リガンドであり、分子量 40 Kda の細胞表面タンパク質である。Fas リガンドは、その構造から、TNF ファミリーであることが分かっている。F

apoptosis.

From these, currently then, it comes to consider that apoptosis and a program cell death are not necessarily the same, and both distinguish.

【0005】

It makes as the factor or the substance which induces apoptosis, and many thing is known currently.

Fas (Fas antigen) is known as cell surface protein which carries apoptosis.

Fas was isolated as cell surface protein which transmits the signal of death to a cell. It is I type cytoplasmic-membrane penetration type protein of molecular-weight 45Kda belonging to a TNF/NGF receptor family.

The member of a TNF/NGF receptor family is considered that the most is a receptor with respect to a respectively specific ligand.

Fas is also considered to be a receptor with respect to the ligand which carries the signal of apoptosis.

By connecting with Fas ligand whose Fas is the ligand, the switch of apoptosis is turned on and the cell which is expressing Fas dies and results.

【0006】

Fas ligand is a physiological ligand of Fas.

It is cell surface protein of molecular-weight 40Kda.

The structure shows that Fas ligand is TNF family.

Fas ligand has the activity which induces apoptosis to the cell which is expressing Fas.

Fasリガンドは、Fasを発現している細胞にアポトーシスを誘導する活性を有している。FasとFasリガンドの系（すなわち、Fasシステム）は、アポトーシスに関して、現在までに最も研究が進展している分野であり、多くの研究報告がなされている。例えば、Fasがアポトーシスのスイッチの役割を果たすことは、米原らの抗Fas抗体の作製に関する論文（J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989年）にまでさかのぼることができる。その後、Fas遺伝子のクローニングにより、Fasの構造が明らかにされている（Cell vol. 66, p. 233-243, 1991年）。さらに、エイズ原因ウイルスHIV感染T細胞に、Fasが発現していること（Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990年）、抗Fas抗体（Jo-2抗体）をマウスに投与すれば、マウスは激症肝炎に似た現象を起こして死ぬこと（Nature vol. 364, p. 806-809, 1993年）等が報告されている。この他にも種々の研究報告がなされ、これらについては実験医学vol. 11, No. 17, 1993年の「アポトーシス-細胞死の構造-」羊土社版、及び実験医学vol. 13, No. 16, 1995年の「アポトーシス研究の最前線-シグナル伝達構造から疾患まで」羊

The system (that is, Fas system) of Fas and Fas ligand is related with apoptosis.

It is the field in which research is progressing to until most currently.

Many research report is made.

For example, that Fas does the role of the switch of apoptosis can go back even to the paper (J. Exp. Med., vol. 169, p. 1747-1756, 1989) about preparation of the anti- Fas antibody by Yonehara.

After that, the cloning of Fas gene clarifies the structure of Fas (Cell vol. 66, p. 233-243, 1991).

Furthermore, the thing which Fas is expressing to the AIDS causative-virus HIV infection T cell (Proc. Natl. Acad. Sci., USA, vol. 87, p. 9620-9624, 1990), If an anti- Fas antibody (Jo-2 antibody) is administered to a mouse, a mouse generating the phenomenon similar to the fulminant hepatitis, and dying (Nature vol. 364, p. 806-809, 1993) etc. is reported.

In addition various research reports are made and these are summarized into below in detail. Experimental-medicine vol. 11, No. 17, the "structure of an apoptosis -cell death]- Yodosha version in 1993, And experimental-medicine vol. 13, No. 16, the Yodosha version "from the forefront of apoptosis research - signal-transduction structure to the disease" in 1995.

土社版に詳しくまとめられている。

【0007】

肝臓に関しては、前述の抗Fas抗体（Jo-2抗体）投与によるマウスの劇症肝炎発症以外にも、種々の報告がなされている。これらの報告内容は、実験医学 vol. 13, No. 16, p. 200-204, 1995年に、「肝炎とアポトーシス」と題する論文としてまとめられている。この文献によれば、肝炎に関し、以下のようなことが判明している。

(1) 慢性肝炎において、活動性の指標となる piecemeal necrosis (削りとり壊死) は、門脈域周囲で認められるが、この領域で起こる細胞死の全体がネクローシスではなくてアポトーシスである。

(2) ウィルス性肝炎における細胞障害機序については、細胞性免疫が重要な役割をもつている。ウィルス抗原が感染肝細胞内でプロセスされた後、HLAクラスIによって肝細胞表面に提示され、これをCTLが認識し傷害する。

(3) 肝炎ウィルスによる肝細胞障害に、Fasシステムを介したアポトーシスが関与している可能性が考えられる。すなわち、肝浸潤リンパ球がFasリガンドを発現し、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導するという可能性である。

【0008】

[0007]

About the liver, various reports are made besides fulminant-hepatitis onset of the mouse by above-mentioned anti-Fas antibody (Jo-2 antibody) administration.

These content of a report is collected as a paper to be entitled "a hepatitis and apoptosis" in experimental-medicine vol.13, No.16, p.200-204, and 1995.

According to this literature, it is related with a hepatitis and followings have become clear.

(1)

Chronic hepatitis.

WHEREIN, piecemeal used as the active index necrosis (it shaves off and necroses) observes in the surroundings of a portal-vein region.

However, the whole cell death which occurs in this region is not necrosis but apoptosis.

(2)

About the cell-damage mechanism in the viral hepatitis, the cellular immunity has the important role.

It is presented to a hepatic-cell surface by HLA class I after carrying out the process of the virus antigen by infection liver intracellular.

CTL recognizes and carries out the injury of this.

(3)

Possibility that the apoptosis which is through liver Fas system by the hepatitis virus is involving can be considered.

That is, it is possibility that a liver infiltration lymphocyte expresses Fas ligand, apoptosis being induced to the hepatic cell which is expressing Fas antigen.

[0008]

(4) 抗Fas抗体(マウスモノクローナル抗体、IgM分画)を用いた免疫組織学的な手法により、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現についての検討が行われた結果、B型及びC型肝炎組織におけるFas抗原の発現と肝炎の活動性が相關することが分かった。

(5) C型慢性肝炎において、肝内に浸潤している単核球は、Fas抗原を発現している肝細胞にアポトーシスを誘導可能なFasリガンドを表出していることを意味し、肝細胞障害機序にFasシステムを介したアポトーシスが関与することを示唆するものである。

このように、ウイルス性肝炎では、B型及びC型を問わずFas抗原が高発現していることが分かる。しかしながら、Fasリガンド誘導の機序については、細胞内のシグナルなど不明な点も多く、今後の研究課題として残されているのが現状である。

【0009】

(4)

By the immune-tissue study-procedure using the anti-Fas antibody (a mouse monoclonal antibody, IgM fraction), study about an expression of Fas antigen in a B type and a hepatitis-C tissue was performed.

It was found that an expression of Fas antigen in a B type and a hepatitis-C tissue and the activity of a hepatitis correlate as a result.

(5)

Chronic hepatitis C.
WHEREIN, it implies that the mononuclear leukocyte currently infiltrated in a liver has expressed Fas ligand which can induce apoptosis to the hepatocyte which is expressing Fas antigen. It suggests that for liver cell-damage the apoptosis which is through Fas system involves.

Thus, in the viral hepatitis, it turns out that Fas antigen is carrying out a high expression regardless of a B type and a C type.

However, there are also many unknown points, such as the signal of intracellular, about the mechanism of Fas ligand inducing, and remaining as a future research subject is the present condition.

[0009]

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、肝炎の中でもアポトーシスによる肝細胞の死に起因して発症する肝炎の治療に特に効果的な肝炎治療剤を提供することにある。前述したように、肝臓における劇症肝炎やウイルス性肝炎では、その発症において、FasとFasリガンドの系(Fasシステム)が

[PROBLEM ADDRESSED]

Objective of the invention is to provide a hepatitis remedy especially effective for the treatment of the hepatitis which is originated and developed the hepatocyte by apoptosis of a hepatitis dies.

At the fulminant hepatitis in a liver as mentioned above and the viral hepatitis, in the onset

WHEREIN, the system (Fas system) of Fas and Fas ligand considered whether not to involve in a certain form, and these inventors examined earnestly using the antibody with respect to Fas

何らかの形で関与しているのではないかと考え、本発明者たちは、Fasリガンドに対する抗体を用いて鋭意検討を行った結果、in vitroの実験系において、Fasリガンドが肝細胞に障害を与えること、さらには、この障害は、抗Fasリガンド抗体により阻止できることを見出した。また、Fasリガンドに対する抗体が肝炎の発症を抑制することができるという新規な知見を得た。そして、この抗体を有効成分とする製剤が、ウイルス性肝炎などの肝疾患に対する治療薬（抗肝炎剤）として有用であることを見出した。本発明は、これらの知見に基づいて完成するに至ったものである。

【0010】

[0010]

【課題を解決するための手段】
 本発明によれば、ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントを有効成分として含有する肝炎治療剤が提供される。また、本発明によれば、以下のような好ましい実施態様が提供される。

1. ヒトのFasリガンドに対する抗体またはその活性フラグメントが、該Fasリガンドに特異的に反応するモノクローン抗体またはその活性フラグメントである前記の肝炎治療剤。
2. Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされ

[SOLUTION OF THE INVENTION]

According to this invention, the hepatitis remedy which contains a human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment as an active ingredient is provided.

Moreover, according to this invention, the following preferable embodiments are provided.

1. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which is monoclonal antibody to which human's antibody with respect to Fas ligand or its active fragment reacts to this Fas ligand specifically, or its active fragment.

2. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which suppresses apoptosis of liver caused when Fas ligand connects into cell of liver which is expressing Fas.

3. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent which improves function of liver by improving blood value of GOT and GTP.

ligand.

As a result, in Experiment system of vitro WHEREIN, it discovered further that Fas ligand does damage to a hepatic cell, and that this damage could be blocked by the anti- Fas ligand antibody.

Moreover, the novel findings that the antibody with respect to Fas ligand could suppress the onset of a hepatitis were obtained.

And, the formulation which make this antibody an active ingredient discovered that it was useful as therapeutic agent (anti- hepatitis agent) with respect to hepatic disorders, such as the viral hepatitis.

This invention came to complete based on these findings.

る肝臓のアポトーシスを抑制する前記の肝炎治療剤。

3. 血中のGOT及びGTPの値を改善することにより、肝臓の機能を改善する前記の肝炎治療剤。

【0011】

4. ヒトのFasリガンドに対する抗体の活性フラグメントが、 $F(ab')_2$ 、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体からなる群より選ばれる少なくとも1種である前記の肝炎治療剤。

5. ヒトのFasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044、FERMBP-5045、FERM BP-5046、FERM BP-5047、及びFERM BP-5048として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株のいずれか一つから產生されるモノクローナル抗体である前記の肝炎治療剤。

6. 前記モノクローナル抗体の超可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

7. 前記モノクローナル抗体の可変領域を少なくとも含むキメラ抗体分子である肝炎治療剤。

【0012】

【発明の実施の形態】
本発明の肝炎治療剤の有効成分

[0011]

4. The above-mentioned hepatitis therapeutic agent whose active fragment of antibody with respect to human's Fas ligand is at least one kind chosen out of group consisting of $F(ab')_2$, Fab', Fab and Fv, and recombinant Fv body.

5. The above-mentioned hepatitis remedy which is monoclonal antibody by which monoclonal antibody which reacts to human's Fas ligand specifically is produced from any one of each hybridoma cell strains deposited to Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology as FERM(acceptance number) BP-5044, FERMBP-5045, FERM BP-5046, FERM BP-5047, and FERM BP-5048.

6. Hepatitis therapeutic agent which is chimera antibody molecule which contains at least hypervariable region of above-mentioned monoclonal antibody.

7. Hepatitis therapeutic agent which is chimera antibody molecule which contains at least variable region of above-mentioned monoclonal antibody.

[0012]

[Embodiment]
The antibody (that is, anti- FasL antibody) with respect to Fas ligand used as an active

として使用されるFasリガンドに対する抗体（すなわち、抗FasL抗体）は、細胞表面分子であるFasリガンド、及びマトリックスマタロプロテアーゼにより分解されて細胞培養上清液や生体の体液中に存在する可溶性Fasリガンド（sFasL）を認識する抗体である。Fasリガンドに対する抗体としては、Fasリガンドに特異的に反応するモノクローナル抗体が好ましい。さらには、FasリガンドとFasとの結合を阻害することができる抗体がより好ましい。このようなモノクローナル抗体は、例えば、次のような方法により得ることができる。

【0013】

(1) 動物（例、マウスなどの齧歯類動物）を、Fasリガンドを発現させたCOS細胞で免疫感作する。ただし、動物としては、Fasの機能を欠損したものを選ぶ。

(2) この免疫感作した動物から抗体産生細胞を調製して、その懸濁液を形成する。主として、脾臓細胞やリンパ節細胞を用いるが、末梢リンパ球を用いてもよい。脾臓細胞を使用する場合には、この免疫感作した齧歯類動物から脾臓を摘出して、脾細胞の懸濁液を形成する。

(3) 該抗体産生細胞の懸濁液をミエローマ細胞と混合して両細胞を融合する。例えば、該脾細胞の懸濁液をマウスのミエローマ細胞と融合促進剤（例、ポリエチレンギリコール）の存在

ingredient of the hepatitis therapeutic agent of this invention is an antibody which recognizes Fas ligand which is a cell surface molecule, and soluble Fas ligand (sFasL) which is decomposed by the matrix metalloprotease and exists in a cell-culture supernatant liquid or the body fluid of a living body.

The monoclonal antibody which reacts to Fas ligand specifically as an antibody with respect to Fas ligand is preferable.

Furthermore, the antibody which can obstruct a connection with Fas ligand and Fas is more preferable.

Such a monoclonal antibody can be obtained by the following methods, for example.

[0013]

(1)

The immunity sensitization of the animal (rodent animals, such as an example and a mouse) is carried out in COS cell which made Fas ligand express.

However, as an animal, that which was a loss lacking in the function of Fas is chosen.

(2)

An antibody producing cell is prepared from this animal that carried out the immunity sensitization.

The suspension is formed.

Spleen cell and a lymph-node cell are mainly used.

However, a peripheral lymphocyte may be used.

In using spleen cell, it extracts spleen from this rodent animal that carried out the immunity sensitization.

The suspension of a spleen cell is formed.

(3)

The suspension of this antibody producing cell is mixed with a myeloma cell, and a both cell is united.

下で混合して両細胞を融合する。電気的処理により細胞融合させることもできる。ここで用いるミエローマ細胞としては、次の選択培養において、抗体産生細胞と識別可能なものの（例、8-アザグアニン耐性株）を用いる。

【0014】

（4）融合した細胞を未融合のミエローマ細胞を支持しない媒質中で希釈して培養し、抗体産生細胞とミエローマ細胞とが融合したハイブリドーマを選別する。すなわち、抗体産生細胞は生存できるが、ミエローマ細胞は死滅する選択倍地中で培養して、抗体産生細胞とミエローマ細胞が融合したハイブリドーマを選別する。選択培地としては、例えば、8-アザグアニン耐性ミエローマ細胞を用いた場合には、一般に、HAT培地（すなわち、ヒポキサンチン-アミノブテリジン-チミジン培地）を用いる。

（5）ハイブリドーマを含有する培養上清液分泌されている抗体が、Fasリガンドを発現させたCOS細胞の上清中に存在するFasリガンドによるFas発現細胞への攻撃を阻害することを指標にして、所望の抗原に対するものか否かを決定する。

【0015】

（6）所望の抗体を分泌してい

For example, the suspension of this spleen cell is mixed in the presence of the myeloma cell and the fusion promoter (the example, polyethyleneglycol) of a mouse, and a both cell is united.

A cell fusion can be carried out by electric process.

As a myeloma cell used here, in the following selective culture

WHEREIN, a thing discriminable from an antibody producing cell is used (an example, 8-azaguanine resistant stock).

[0014]

(4)

It dilutes and cultivates in the medium which does not support the myeloma cell whose united cell is not united.

The hybridoma which the antibody producing cell and the myeloma cell united is selected.

That is, an antibody producing cell can survive.

However, a myeloma cell is cultivated in the selection times underground which becomes extinct.

The hybridoma which the antibody producing cell and the myeloma cell united is selected.

When as a selective medium, for example, a 8-azaguanine resistant myeloma cell is used, HAT culture medium (that is, hypoxanthine-aminopterin-thymidine culture medium) is used generally.

(5)

The antibody containing a hybridoma by which culture supernatant-liquid secretion make it the index to obstruct the attack to Fas expression cell by Fas ligand which exists in the supernatant liquid of COS cell which made Fas ligand express.

It determines whether to be a thing with respect to a desired antigen.

[0015]

(6)

The cell group in the culture well in which the

る細胞が存在する培養ウェル中の細胞群をクローニングする。

クローニングは、通常、限界希釈法により行う。

(7) 所望の抗体を分泌しているクローニングを選択する。

(8) 再度クローニングを行つて、所望の抗原に対するモノクローナル抗体を分泌しているハイブリドーマクローニングを樹立する。

(9) このハイブリドーマの培養上清液、あるいは該ハイブリドーマをマウス（例、ヌードマウス）腹腔内に投与して得られた腹水中からモノクローナル抗体を調製する。

【0016】

本発明の肝炎治療剤の有効成分として使用するモノクローナル抗体としては、例えば、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号 F E R M B P - 5 0 4 4 (ハイブリドーマ NOK 1)、F E R M B P - 5 0 4 5 (ハイブリドーマ NOK 2)、F E R M B P - 5 0 4 6 (ハイブリドーマ NOK 3)、F E R M B P - 5 0 4 7 (ハイブリドーマ NOK 4)、及び F E R M B P - 5 0 4 8 (ハイブリドーマ NOK 5) として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体 (NOK 1 ~ 5) を挙げることができる。

【0017】

ヒトの F a s リガンドに対する抗体は、免疫グロブリンである。ヒトの F a s リガンドに特

cell which is secreting a desired antibody exists is cloned.

A cloning is usually performed with a threshold dilution method.

(7)

The clone which is secreting a desired antibody is selected.

(8)

It clones again and the hybridoma clone which is secreting the monoclonal antibody with respect to a desired antigen is established.

(9)

A monoclonal antibody is prepared out of the abdominal dropsy which administers the culture supernatant liquid of this hybridoma, or this hybridoma to mouse (example, nude mouse) intraperitoneal, and was obtained.

[0016]

As a monoclonal antibody used as an active ingredient of the hepatitis therapeutic agent of this invention For example, it is acceptance-number FERM to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology BP-5044 (hybridoma NOK 1), FERM BP-5045 (hybridoma NOK 2), FERM BP-5046 (hybridoma NOK 3), FERMBP-5047 (hybridoma NOK 4), And FERM BP-5048 (hybridoma NOK 5). Each monoclonal antibody (NOK 1-5) produced from each hybridoma cell strain these-deposited can be mentioned.

[0017]

The antibody with respect to a human's Fas ligand is an immunoglobulin.

The monoclonal antibody which reacts to a human's Fas ligand specifically is a uniform

異的に反応するモノクローナル抗体は、均一な免疫グロブリンであり、例えば、(1) IgM のクラスに属し、L鎖がκ鎖であるもの、(2) IgG_{2a} のサブクラスに属し、L鎖がκであるもの、(3) IgG₁ のサブクラスに属し、L鎖がκ鎖であるもの、(4) IgG₃ のサブクラスに属し、L鎖がκ鎖であるものなどが存在する。

【0018】

Fasリガンドに対する抗体の活性フラグメントは、抗Fasリガンド抗体の有する抗原抗体反応活性を有する免疫グロブリンのフラグメントを意味する。このような活性フラグメントとしては、具体的には、F(a b')₂、Fab'、Fab、Fv、及び組換えFv体などがある。これらの活性フラグメントは、免疫グロブリン（抗FasL抗体）から常法により調製することができる。例えば、F(a b')₂フラグメントは、免疫グロブリンIgGをペプシンを用いて消化することにより得ることができる。Fab'フラグメントは、F(a b')₂フラグメントを2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化することにより得ることができる。Fabのフラグメントは、IgGをパパイン消化することにより得ることができる。Fvフラグメントは、H鎖可変部(V_H)とL鎖可変部(V_L)を非共役結合で結合して得られる。組換えFv体は、例えば、

immunoglobulin.

For example, it belongs to the class of (1) IgM, it belongs to the subclass of that whose L chain is a chain (kappa), and (2) IgG2a, and it belongs to that whose L chain is (kappa), and the subclass of (3) IgG1.

L chain belongs to that which is a chain (kappa), and the subclass of (4) IgG3, and that whose L chain is a chain (kappa) exists.

[0018]

The active fragment of the antibody with respect to Fas ligand means the fragment of the immunoglobulin which has the antigen-antibody-reaction activity which an anti-Fas ligand antibody has.

As such an active fragment, there are F(ab')₂, Fab', Fab and Fv, recombinant Fv body, etc. specifically.

These active fragments can be prepared by the conventional method from an immunoglobulin (anti-FasL antibody).

For example, F(ab')₂ fragment can be obtained by digesting an immunoglobulin IgG using pepsin.

Fab' fragment can reduce F(ab')₂ fragment with reagents, such as 2-mercaptoethanol, and can obtain it by alkylating by mono iodoacetic acid.

The fragment of Fab can be obtained by carrying out papain digestion of the IgG.

Fv fragment connects a heavy-chain variable region (VH) and a L-chain variable region (VL) by nonconjugated connection, and is obtained. As for recombinant Fv body, the sequence of DNA is carried out about the gene which hits the variable region of the heavy chain of an antibody, and L chain from the hybridoma which produces a monoclonal antibody, for example, and

The base sequence which codes a heavy-chain variable region (VH) and a L-chain variable region (VL) is determined, and then, these DNA fragments can be integrated in a

モノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから抗体のH鎖及びL鎖の可変部にあたる遺伝子についてDNAをシーケンスして、H鎖可変部（V_H）とL鎖可変部（V_L）をコードする塩基配列を決定し、次いで、これらのDNA断片をベクターに組み込んで、V_H—Linker—V_L構造を有する一価の抗体活性フラグメントを大腸菌や動物細胞等の細胞に產生させることにより得ることができる。

【0019】

本発明の実施例で使用したSCIDマウスは、ヒトの細胞を移植することができる動物として有名である。このSCIDマウスは、1983年にBosmaらにより、成熟したリンパ球（T細胞及びB細胞）を全くもたない免疫不全ミュータントマウスとして発見されたマウスである（Nature, vol. 301, p. 527-530, 1983）。このマウスは、ヒトの重症複合免疫不全症（SCID）と同様の病態を呈する。このSCIDマウスにヒトの自己免疫疾患である原発性胆汁性肝硬変症SLE、自己免疫性甲状腺炎等の患者のリンパ球やリンパ組織を移入し、病象の再現を試みる動きがある。これらは、J. Exp. Med., vol. 170, p. 1919-1930, 1989, J. Exp. Med., vol. 172, p. 985-988, 1990, Clin. Exp. Immunol., vol. 84, vol. 84, p. 34-37 1991 years etc.

vector and it can obtain by making cells, such as an Escherichia coli and an animal cell, produce the monovalent antibody active fragment which has VH-Linker-VL structure.

[0019]

SCID mouse used in the Example of this invention is famous as an animal which can transplant a human's cell.

This SCID mouse is a mouse discovered by Bosma et al. by making as the immunodeficiency mutant mouse which does not have at all the lymphocyte (the T cell and B cell) which ripened in 1983 (Nature, vol. 301, p.527- 530, 1983).

This mouse presents the illness condition similar to a human's severe-combined-immunodeficiency disease (SCID).

A patient's lymphocyte and lymphatic tissues which are a human's autoimmune-disease diseases, such as primary bile property cirrhosis SLE and the autoimmune thyroiditis, are introduced into this SCID mouse, and there is a motion which tries reproduction of the sickness.

These describes in J.Exp.Med., vol.170, p.1919- 1930, 1989, J.Exp.Med., vol.172, and p.985- in 988, 1990, Clin.Exp.Immunol., vol.84, and p.34-37 1991 years etc.

Moreover, the same trial is reported in Sciece, vol.241, p.1632-1639, and 1988.

—37, 1991年などに記載されている。また、同じような試みが *Science*, vol. 241, p. 1632—1639, 1988年に報告されている。

【0020】

本発明者は、SCIDマウスの腹腔内にヒトの末梢血単核細胞(PBMC)を投与し、投与後、6時間ないし12時間後に、D-ガラクトサミン20mg/マウスとSEB(*Staphylococcal enterotoxin B*)10μg/マウスを同じく腹腔内に投与することで、肝炎を引き起こすことに成功した。この系は、Fasを発現しているSCIDマウスにヒトのPBMCを入れ、このマウスにDガラクトサミンとSEB刺激することで、導入したヒトPBMC中のT細胞が活性化し、細胞の表面にFasリガンドを発現するとともに、マウスの腹腔内及び体液中に可溶性のFasリガンドが分泌されることで、Fasを発現しているマウス肝細胞がFasリガンドを介して、アポトーシスで死滅し、その結果として、肝炎が発症するという系である。

【0021】

本発明の肝炎治療剤は、Fasを発現している肝臓の細胞にFasリガンドが結合することにより引き起こされる肝臓のアポトーシスを抑制することにより、肝炎を治療するものと推定される。より詳細には、Fas

【0020】

This inventor administers a human's peripheral-blood mononuclear cell (PBMC) to intraperitoneal of SCID mouse.

After administration, 6 hour thru hours [12 hours] after, they are D-galactosamine 20 mg / mouse, and SEB (by administering *Staphylococcal enterotoxin B*)10 micro-g / mouse to intraperitoneal similarly, it succeeded in causing a hepatitis.

This system puts a human's PBMC into SCID mouse which is expressing Fas, and D galactosamine and the T cell in human PBMC introduced by being stimulating SEB activate it to this mouse. Fas ligand is expressed on the surface of a cell. The mouse hepatocyte which is expressing Fas by the inside of an abdomen of a mouse and Fas ligand soluble in a body fluid being secreted becomes extinct by apoptosis through Fas ligand.

As a result, it is the system that a hepatitis develops.

【0021】

The hepatitis therapeutic agent of this invention is estimated to be that which treats a hepatitis by suppressing apoptosis of the liver caused when Fas ligand connects into the cell of the liver which is expressing Fas.

More specifically, the switch of apoptosis is turned on when Fas connects the hepatic cell which is expressing Fas, with Fas ligand.

を発現している肝細胞は、FasがFasリガンドと結合することにより、アポトーシスのスイッチが入るが、本発明の肝炎治療剤は、このような反応を抑制することにより肝炎を治療するものと推定される。また、本発明の肝炎治療剤は、肝機能を改善し、血中のGOT（グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）及びGPT（グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ）の値を改善することができる。具体的には、本発明の肝炎治療剤は、血中のGOT及びGPTの濃度を正常値に回復させることができる。

【0022】

本発明で使用するFasリガンドに対するモノクローナル抗体（抗FasL抗体）またはその活性フラグメントの肝炎治療剤としてヒトに作用させる場合、HAMA等の外来蛋白質に対する抗体の生成を抑えて効果的に作用させるためには、該抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することが効果的である。これらに関する技術は、すでに公知の文献あるいは特許公報に記載されており、抗体産生ハイブリドーマさえあれば、容易に実施することができる。特許公報では、EP-A-01220694、EP-0125023、EP-0171496、EP-A-0173494、WO86101533等があり、一般文献としては、Nature, Vol.322, p.323-327 (1988), Nature, vol.321, p.522-525 (1986), Nature, vol.328, p.731-734 (1987), etc. are mentioned.

However, the hepatitis therapeutic agent of this invention is estimated to be that which treats a hepatitis by suppressing such reaction. Moreover, the hepatitis therapeutic agent of this invention improves a liver function.

The blood value of GOT (glutamic-acid-oxalacetic-acid transaminase) and GPT (glutamic-acid-pyruvic-acid transaminase) is improvable.

The hepatitis therapeutic agent of this invention can make normal values recover blood concentration of GOT and GPT specifically.

[0022]

It is effective human-type-ization or to form this anti- FasL antibody or its active fragment into a chimera type, in order to control a formation of the antibody with respect to a HAMA etc. visitor protein and to make act effectively, when making act on a human as the monoclonal antibody (anti- FasL antibody) with respect to Fas ligand used by this invention, or a hepatitis therapeutic agent of the active fragment. The technique about these is already described in well-known literature or the patent gazette.

If there is even an antibody-production hybridoma, it can be performed easily.

In the patent gazette, there are EP-A-0120694, EP-0125023, EP-0171496, EP-A-0173494, WO86101533, etc.

As common literature, Nature, Vol.322, p.323-327 (1988), Nature, vol.321, p.522-525 (1986), Nature, vol.328, p.731-734 (1987), etc. are mentioned.

The public knowledge technique currently shown by these being based, an anti- FasL antibody or its active fragment, human-type-izing or a chimera type can be formed.

3-327 (1988)、Nature, vol. 321, p. 522-525 (1986)、Nature, vol. 328, p. 731-734 (1987) 等が挙げられる。これらに開示されている公知技術に基づいて、抗FasL抗体またはその活性フラグメントをヒト型化あるいはキメラ型化することができる。

【0023】

ヒト型化あるいはキメラ型化するに際し、工業技術院生命工学工業技術研究所に受託番号FERM BP-5044 (ハイブリドーマNOK1)、FERM BP-5045 (ハイブリドーマNOK2)、FERM BP-5046 (ハイブリドーマNOK3)、FERM BP-5047 (ハイブリドーマNOK4)、及びFERM BP-5048 (ハイブリドーマNOK5) として寄託されている各ハイブリドーマ細胞株から產生される各モノクローナル抗体 (NOK1~5) の可変領域のアミノ酸配列を少なくとも含ませることが好ましい。

【0024】

このようなモノクローナル抗体NOK1~5のH鎖及びL鎖の可変領域のアミノ酸配列及びその塩基配列は、本発明者らが見いだしたものであり、配列表に記載する。

(1) ハイブリドーマNOK1が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表

【0023】

It faces human-type-ization or forming a chimera type, and it is acceptance-number FERM to the Agency of Industrial Science and Technology National Institute of Bioscience and Human-Technology. BP-5044 (hybridoma NOK 1), FERMBP-5045 (hybridoma NOK 2), FERM BP-5046 (hybridoma NOK 3), FERM BP-5047 (hybridoma NOK 4), And FERM BP-5048 (hybridoma NOK 5). it is preferable to contain at least the amino acid sequence of the variable region of each monoclonal antibody (NOK 1-5) produced from each hybridoma cell strain deposited as these,

【0024】

The present inventors found out the amino acid sequence of the variable region of the heavy chain of such monoclonal-antibody NOK 1-5, and L chain, and its base sequence.

It describes in a sequence table.

(1)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 1 produces is (1) Ser of 30th to 34th Asn, (2) Arg of 49th to 65th Gly, and (3) Tyr of 93rd to

の配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の(1) 30 番目の S e r から 34 番目の A s n 、(2) 49 番目の A r g から 65 番目の G 1 y 、及び(3) 93 番目の T y r から 109 番目の T y r であり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 3 で表されるアミノ酸配列の(1) 24 番目の A r g から 34 番目の A s n 、(2) 50 番目の T y r から 56 番目の S e r 、及び(3) 89 番目の G 1 n から 97 番目の T h r である。

【0025】

(2) ハイブリドーマ NOK 2 が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 5 で表されるアミノ酸配列の(1) 30 番目の A s n から 34 番目の G 1 y 、(2) 49 番目の T y r から 65 番目の G 1 y 、及び(3) 93 番目の T y r から 107 番目の T y r であり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 7 で表されるアミノ酸配列の(1) 24 番目の L y s から 39 番目の G 1 y 、(2) 55 番目の L e u から 61 番目の S e r 、及び(3) 95 番目の G 1 n から 102 番目の T h r である。

【0026】

(3) ハイブリドーマ NOK 3 が產生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 9 で表されるアミノ酸配列の(1) 30 番目の S e r から 34 番目の A s n 、(2) 49 番目の A r g から 65 番目の

109th Tyr of the amino acid sequence expressed with sequence number 1 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 34th Asn from Arg of 24th, (2) Tyr of 50th to 56th Ser, and (3) Gln of 89th to 97th Throf the amino acid sequence expressed with sequence number 3 of a sequence table.

[0025]

(2)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 2 produces is (1) 34th Gly from Asn of 30th, (2) Tyr of 49th to 65th Gly, (3) Tyr of 93rd to 107th Tyrof the amino acid sequence expressed with sequence number 5 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 39th Gly from Lys of 24th, (2) Leu of 55th to 61st Ser, (3) 102nd Thr from Gln of 95th of the amino acid sequence expressed with sequence number 7 of a sequence table.

[0026]

(3)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 3 produces is (1) 34th Asn from Ser of 30th, (2) Arg of 49th to 65th Gly, (3) Tyr of 93rd to 105th Valof the amino acid sequence expressed with sequence number 9 of a sequence table.

G 1 y 、及び(3) 9 3 番目の T y r から 1 0 5 番目の V a l である。

[0027]

(4) ハイブリドーマNOK 4 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 1 1 で表されるアミノ酸配列の(1) 3 2 番目の T y r から 3 5 番目の A s n 、(2) 5 0 番目の T y r から 6 5 番目の A s n 、及び(3) 9 3 番目の T y r から 1 0 7 番目の T y r であり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 1 3 で表されるアミノ酸配列の(1) 2 4 番目の A r g から 3 8 番目の H i s 、(2) 5 4 番目の A r g から 6 0 番目の S e r 、及び(3) 9 3 番目の G 1 n から 1 0 1 番目の T h r である。

[0028]

(5) ハイブリドーマNOK 5 が産生するモノクローナル抗体のH鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 1 5 で表されるアミノ酸配列の(1) 3 0 番目の T h r から 3 4 番目の H i s 、(2) 4 9 番目の T y r から 6 5 番目の A s p 、及び(3) 9 3 番目の T y r から 1 0 6 番目の T y r であり、L鎖の超可変領域は、配列表の配列番号 1 7 で表されるアミノ酸配列の(1) 2 4 番目の L y s から 3 4 番目の A 1 a 、(2) 5 0 番目の T y r から 5 6 番目の T h r 、及び(3) 8 9 番目の G 1 n から 9 7 番目の T h r である。

[0027]

(4)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 4 produces is (1) 35th Asn from Tyr of 32nd, (2) Tyr of 50th to 65th Asn, and (3) Tyr of 93rd to 107th Tyr of the amino acid sequence expressed with sequence number 11 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 38th His from Arg of 24th, (2) Arg of 54th to 60th Ser, And (3) Gln of 93rd to 101st Throf the amino acid sequence expressed with sequence number 13 of a sequence table.

[0028]

(5)

The hypervariable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 5 produces is (1) 34th His from Thr of 30th, (2) Tyr of 49th to 65th Asp, And (3) Tyr of 93rd to 106th Tyrof the amino acid sequence expressed with sequence number 15 of a sequence table.

The hypervariable region of L chain is (1) 34th Ala from Lys of 24th and (2) Tyr of 50th to 56th Thr, And (3) 97th Thr from Gln of 89th of the amino acid sequence expressed with sequence number 17 of a sequence table.

【0029】

(6) ハイブリドーマNOK 1
が產生するモノクローナル抗体
のH鎖の可変領域は、配列番号
1で表されるアミノ酸配列であ
り、その塩基配列は、配列番号
2の塩基配列である。また、L
鎖の可変領域は、配列番号3で
表されるアミノ酸配列であり、
その塩基配列は、配列番号4の
塩基配列である。

[0029]

(6)

The variable region of the heavy chain of the
monoclonal antibody which hybridoma NOK 1
produces is an amino acid sequence shown
with sequence number 1.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 2.

Moreover, the variable region of L chain is an
amino acid sequence shown with sequence
number 3.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 4.

【0030】

(7) ハイブリドーマNOK 2
が產生するモノクローナル抗体
のH鎖の可変領域は、配列番号
5で表されるアミノ酸配列であ
り、その塩基配列は、配列番号
6の塩基配列である。また、L
鎖の可変領域は、配列番号7で
表されるアミノ酸配列であり、
その塩基配列は、配列番号8の
塩基配列である。

[0030]

(7)

The variable region of the heavy chain of the
monoclonal antibody which hybridoma NOK 2
produces is an amino acid sequence shown
with sequence number 5.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 6.

Moreover, the variable region of L chain is an
amino acid sequence shown with sequence
number 7.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 8.

【0031】

(8) ハイブリドーマNOK 3
が產生するモノクローナル抗体
のH鎖の可変領域は、配列番号
9で表されるアミノ酸配列であ
り、その塩基配列は、配列番号
10の塩基配列である。

[0031]

(8)

The variable region of the heavy chain of the
monoclonal antibody which hybridoma NOK 3
produces is an amino acid sequence shown
with sequence number 9.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 10.

【0032】

(9) ハイブリドーマNOK 4
が產生するモノクローナル抗体
のH鎖の可変領域は、配列番号
11で表されるアミノ酸配列であ
り、その塩基配列は、配列番
号12の塩基配列である。また、L
鎖の可変領域は、配列番
号13で表されるアミノ酸配列

[0032]

(9)

The variable region of the heavy chain of the
monoclonal antibody which hybridoma NOK 4
produces is an amino acid sequence shown
with sequence number 11.

The base sequence is a base sequence of
sequence number 12.

Moreover, the variable region of L chain is an
amino acid sequence shown with sequence

であり、その塩基配列は、配列番号 14 の塩基配列である。

[0033]

(10) ハイブリドーマNOK 5が產生するモノクローナル抗体のH鎖の可変領域は、配列番号 15 で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号 16 の塩基配列である。また、L鎖の可変領域は、配列番号 17 で表されるアミノ酸配列であり、その塩基配列は、配列番号 18 の塩基配列である。

[0034]

本発明の肝炎治療剤の剤形としては、活性な有効成分を含む通常の医薬または医薬組成物と同様に、例えば、注射剤、錠剤、カプセル剤、坐薬、噴霧剤、クリーム剤、パップ剤、点眼剤等を挙げることができる。例えば、注射剤であれば、当該抗体を含む溶液を無菌状態で調製し、必要があれば、マンニトール等の安定化剤、賦形剤等を補助成分として添加してもよい。これをアンプル、バイアル等に充填し、そのまま使用することもできるし、必要に応じて、凍結乾燥等を行うことも可能である。本発明の肝炎治療剤は、乾燥品の場合は、注射用蒸留水等に溶解して投与することができる。投与方法は、経口投与、静脈注射、吸入、経皮投与、点眼、局所投与、皮下投与等から適切な方法を選んで投与すればよい。本発明の肝炎の治療剤は、Fas リガンドに対する抗体ま

number 13.

The base sequence is a base sequence of sequence number 14.

[0033]

(10)

The variable region of the heavy chain of the monoclonal antibody which hybridoma NOK 5 produces is an amino acid sequence shown with sequence number 15.

The base sequence is a base sequence of sequence number 16.

Moreover, the variable region of L chain is an amino acid sequence shown with sequence number 17.

The base sequence is a base sequence of sequence number 18.

[0034]

An injection, a tablet, a capsule, a suppository, a spray, a cream agent, a poultice, eyedrops, etc. can be mentioned like the usual pharmaceutical or the pharmaceutical composition which contains an active ingredient as a formulation of the hepatitis therapeutic agent of this invention.

For example, as long as it prepares the solution which contains the concerned antibody if it is an injection, by the aseptic condition and there is necessity, it may add, making stabilizers, such as a mannitol, an filler, etc. as an assistant component.

This is filled to an ampoule, a vial, etc., and

Can also use then.

Freeze-dried etc. can also be performed depending on necessity.

In the case of the drying goods, the hepatitis therapeutic agent of this invention can be dissolved in the water for injection etc., and can administer.

The administration method chooses a suitable method out of oral administration, intravenous injection, inhalation, percutaneous administration, eyedropping, a local administration, a subcutaneous administration, etc., and should just administer it.

The therapeutic agent of the hepatitis of this

たはその活性フラグメントを有効成分として、通常、0.1～100重量%、好ましくは0.5～70重量%の割合で含有するものである。本発明の肝炎治療剤の投与量は、有効成分を基準として、ヒト成人1日あたり、通常、0.001～1000mg、好ましくは0.01～600mgである。もちろん、上記投与量は、一応の目安であり、患者の年齢、性別、体重、さらには疾患の種類とその程度に応じた投与量を適宜選択すればよい。

【0035】

【実施例】

以下に実施例を挙げて、本発明についてより具体的に説明する。

【0036】

【実施例1】

(1) マウス肝細胞の調製

マウス肝細胞は、三井等編「機能細胞の分離と培養」(昭和62年1月30日丸善株式会社発行)第178～179頁に記載されているコラゲナーゼ灌流法を準用して分離した。すなわち、

(1) 麻酔後、マウスを手術台上に乗せ、手術用ハサミで皮膚、腹筋の順に開腹した。よくしぼったアルコール脱脂綿で腸を術者の右側にかきよけ、門脈を十分露出させた。

invention make an active ingredient the antibody with respect to Fas ligand, or its active fragment, and it is 0.1-100 weight% usually.

Preferably, it contains at a ratio of 0.5-70 weight%.

The dosage of the hepatitis remedy of this invention is as the reference standard set to the active ingredient, for a human adult, it is 0.001-1000 mg usually per day.

Preferably, it is 0.01-600 mg.

Of course, an above dosage is a general standard.

What is sufficient is just to select a dosage suitably depending on the kind and the its level of a patient's age, gender, a body weight, and also the disease.

[0035]

[Example]

An Example is given to below.

It more specifically about this invention explains.

[0036]

[Example 1]

(1)

Preparation of a mouse hepatic cell

The mouse hepatic cell applied correspondingly and separated the collagenase perfusion method currently described in 78-179 pages of edition "separation of a functional cell, and culture" (January 30th, Showa 62 Maruzen Co., Ltd. K.K. issue) firsts, such as Mitsui & Co., Ltd.

That is

(1) The mouse was put on the operation table after anesthesia, and it performed laparotomy in the order of the skin and the abdominal muscle with surgical scissors.

With it, intestines were written to the right-hand side of an operator with the alcohol

(2)門脈に縫合糸のループをかけ眼科用ハサミの先端を使って門脈に切れ目を入れた。切開部から溢れ出る血液をカニューレ先端から滴下する前灌流用緩衝液で洗い流しながら、すばやく門脈の切開面からカニューレを挿入し、縫合糸で結紮した。同時に、肝臓下の下大静脈 (subhepatic inferior vena cava) を切断し、洗浄液を放出させた。そのまま 30 ml/min の流速でペリスタポンプを作動させ、37℃に保温した前灌流用緩衝液を灌流し続けた。

【0037】

(3)次に、胸廓部を開き、心臓を露出させた。横隔膜下の下大静脈 (thoracic inferior vena cava) に縫合糸のループをかけた後、右心房を眼科用ハサミで切開して別のカニューレを右心房から下大静脈に挿入し結紮した。こうして、灌流液は、肝臓を循環し横隔膜下の下大静脈を流れ、新しく挿入したカニューレを経由して、恒温槽内の瓶に戻り循環した。この状態で 4~5 分間灌流を続け、スムーズに灌流することを確かめた上でポンプを止め、循環液をコラゲナーゼ溶液 (約 100 ml) に交換し再び灌流を始めた。8~10 分間コラゲナーゼ溶液の灌流を続けると、肝臓は次第に消化され、肝小葉が浮き上がったような外観を呈し、表面から酵素液が滲出してきた。この状態で

absorbent cotton extracted well, and were avoided, and the sufficient exposure of the portal vein was carried out.

(2) The loop of a surgical suture was applied to the portal vein, and the cut was put into the portal vein using the end of ophthalmic scissors.

Flushing the blood which overflows from an incision part, by the buffer for a pre-perfusion dropped from a cannula end, cannula was quickly inserted from the section of the portal vein, and it ligated by the surgical suture.

The inferior vena cava under a liver (subhepatic inferior vena cava) was disconnected, and cleaning liquid was made to release simultaneously.

A peristaltic pump is made to operate by the flow rate of 30 ml/min then.

Before retain heating to 37 degrees-Celsius, perfusing buffer for a perfusion was continued.

[0037]

(3) Next, the chest was opened and the heart was exposed.

Ophthalmic scissors cut a right atrium open, and after applying the loop of a surgical suture to the inferior vena cava under a diaphragm (thoracic inferior vena cava), from the right atrium, another cannula was inserted in the inferior vena cava, and was ligated.

It carries out like this and

A perfuse circulates a liver and flows in the inferior vena cava under a diaphragm.

Via the cannula inserted newly

It returned and circulated into the bottle in a thermostat.

The 4-5 minutes perfusion was continued in this condition, the pump was stopped after having confirmed perfusing smoothly, and the circulation liquid was exchanged for the collagenase solution (about 100 ml), and the perfusion was begun again.

When continuing a perfusion of a 8-10 minutes collagenase solution, a liver is digested gradually and the exterior to which the lobulus hepatis came floating is presented.

The enzyme liquid has exuded from the surface.

灌流を中止し、肝臓各葉をスパーテルで受けつつ、ハサミで切り離しシャーレに移した。約 1.0 ml の MEM (ニッスイ社製) 液を加え、手術用メスで軽く細分すると、消化された肝細胞がとろけるように分散した。次いで、3.0 ml MEM を加え、先太の駒込ピペットで軽く 2~3 回ピッティングし、さらに細胞を分散させた後、2~3 枚のガーゼを重ねた細胞濾過器で濾過した。

【0038】

このようにして、まず、粗分散肝細胞浮遊液を調製した。次いで、この中からさらに肝実質細胞のみをとりだすために、以下の操作を行った。細胞浮遊液を 5.0 ml 細胞遠心管に集め、卓上冷却遠心機で低速遠心 (5.0 × g, 1 min) した。この遠心条件では、肝実質細胞は、他の細胞に比し大きいので遠心管の底にパックされ、非実質細胞、損傷細胞、赤血球、細胞破片等は、沈殿しないで上清中に残る。上清を静かに駒込ピペットで除き、新たに細胞洗浄用緩衝液を加え、細胞を先太の駒込ピペットで軽く懸濁した後、同時に低速遠心した。この操作を 3~4 回繰り返すことにより、ほぼ均一な肝実質細胞を得ることができた。低速遠心操作後、得られた肝実質細胞の viability は、通常 90% 以上 (トリパン青の染色試験) で、その収量は $4 \sim 6 \times 10^7$ 細胞/g 肝臓である。こうして得られたマウス肝細胞に対し、Fas

While a perfusion is stopped by this state and each liver lobe is received by the spatula, It separated with scissors and it moved to the Petri dish.

When about 10 ml MEM (made by Nissui company) liquid was added and it subdivided lightly with the surgical scalpel, it dispersed so that the digested hepatic cell might be dissolved.

Subsequently, 30 ml MEM is added and a pipetting is lightly carried out 2-3 times by the Komagome type pipet with thick point.

Furthermore after making a cell disperse, it filtered by the cell filter which piled up 2-3 gauze.

[0038]

Thus, the rough dispersed hepatic-cell suspension was prepared first.

Subsequently, in order to take out only a hepatic parenchymal cell further out of this, the following operation was performed.

The cell suspension was brought together in 50 ml cell centrifuge tube, and low speed centrifugation (50* g, 1min) was carried out by the desk-top refrigerated centrifuge.

On this centrifugation condition, a hepatic parenchymal cell is compared with another cell, and since it is large, it is packed at the bottom of a centrifuge tube.

A non-real cell, a damage cell, an erythrocyte, a cell broken piece, etc. remain in a supernatant liquid without precipitating.

After having added the buffer for cell washing newly except the supernatant liquid by the Komagome type pipet calmly and suspending a cell lightly by the Komagome type pipet with thick point, low speed centrifugation was carried out simultaneously.

The almost uniform hepatic parenchymal cell was able to be obtained by repeating this operation 3-4 times.

Viability of the obtained hepatic parenchymal cell is 90% or more (dyeing test of tri pan blue) usually after low speed centrifugation operation, and the yield is $4-6 \times 10^7$ cell / g liver.

In this way the cell damage of soluble Fas

sリガンドを導入したトランスフェクタントL5178Y-FasLの培養上清中に含まれる可溶性Fasリガンド（すなわち、sFasL）の細胞障害を検討した。

【0039】

(2) L5178Y-FasL
の調製

ヒトFasリガンドをL5178Yに導入する方法は、以下の通りである。すなわち、PMKit Neoに組み込んだヒトFasリガンド遺伝子1μgに対し、XholとNotI（ベーリンガー社製）の制限酵素を各1単位加え、付属緩衝液を添加後、37℃にて2時間反応させた。この液について、1%アガロース電気泳動を行った。UV照射のもとでFasリガンドに相当する約850pbのバンドを切り出した。このアガロースゲルから、GENCLEAN IIキット(BIO101、フナコシ社製)を用いて、DNAを抽出した。すなわち、付属のNaI液をゲルに加え、65℃で10分間インキュベートし、ゲルを溶かした後、これにグラスマilk (glassmilk)を加え5分間ローテートして、DNAを吸着させた。このグラスマilkをNew-WASH液で3回洗浄後、TE緩衝液10μlに懸濁し、65℃で3分間インキュベートすることによりDNAを溶出させた。次に、BCMG S_{neo}のベクター1μgについても同様にXholとNotIで制限酵素処理を

ligand (that is, sFasL) contained in the culture supernatant liquid of transfectant L5178 Y-FasL which introduced Fas ligand with respect to the obtained mouse hepatic cell was examined.

[0039]

(2)

The method of introducing the preparation human Fas ligand of L5178 Y-FasL to L5178Y is the following passage.

That is, the restriction enzyme of Xhol and NotI (product made from a Boehringer Co., Ltd) with respect to human Fas ligand gene 1 micro-g inserted in PMKit Neo, one unit each added, Attached buffer was made to react for 2 hours by 37 degrees-Celsius after adding.

About this liquid, the agarose electrophoresis was performed 1%.

The band of about 850 pbs which are equivalent to Fas ligand under a UV irradiation was cut down.

From this agarose gel to GENCLEAN DNA was extracted using II kit (BIO101, made by a Funakoshi company).

That is, attached NaI liquid is added to gel and 10 minutes is incubated by 65 degrees-Celsius. After dissolving gel, glass milk (glassmilk) is added to this and 5 minutes rotates.

DNA was made to absorb.

This glass milk is suspended to TE buffer 10 microliter after 3 times washing with a New-WASH liquid.

DNA was made to elute by incubating 3 minutes by 65 degrees-Celsius.

Next, a limited enzyme treatment is similarly carried out by Xhol and NotI about vector 1 micro-g of BCMGSneo. After carrying out an agarose gel electrophoresis 0.75%, it refined using GENECLEANII kit.

行い、0.75%アガロースグル電気泳動を行った後、GENE CLEAN II キットを用いて精製した。

[0040]

次に、Fas リガンドと DNA と BCMGS_{neo} のベクターのライゲーションをベクター : cDNA = 1 : 2 (モル比) になるように混合し、宝酒造社製 DNA ライゲーションキットを用いて、16°C で 16 時間反応させて、ライゲーションした。この反応液を、大腸菌コンピテントセル（東洋紡社製）と混合して、氷上で 30 分間、42°C で 40 秒間インキュベートすることにより、DNA を大腸菌へ導入した。これに対し、SOC 培地を加え、37°C で 1 時間振盪培養後、アンピシリン入りの LB 寒天培地に分注し 37°C にて 1 日間培養した。その後、出現したコロニーを LB 培地で 37°C で 1 日間培養した後、アルカリ法にて、プラスミド（ヒト Fas リガンド - BCMGS_{neo}）を回収した。

[0041]

このヒト Fas リガンド - BCMGS_{neo} 1 μg について、L5178Y 細胞 1 × 10⁶ 個に対し、エレクトロポレーション法にて、遺伝子導入を行った。条件は、ジーンパルサー（バイオラッド社製）を用い、296V、960 μF で実施した。この細胞を再度 10% FCS - RPMI 1640 培地 5 ml に懸濁した。6 well プレートに、こ

[0040]

Next, the ligation of Fas ligand and the vector of DNA and BCMGSneo is mixed so that it may be set to vector:cDNA=1:2 (molar ratio), and using the Takara-Shuzo company DNA ligation kit, by 16 degrees-Celsius, it was made to react for 16 hours and the ligation was carried out.

This reaction solution was mixed with the Escherichia-coli competent cell (made by a Toyobo company), and DNA was introduced to the Escherichia coli by incubating for 40 seconds by 30 minutes and 42 degrees-Celsius by the on ice.

On the other hand, SOC culture medium is added, and it dispensed to the thing LB agar medium including an ampicillin after the 1 hour shaking culture by 37 degrees-Celsius, and it cultivated for 1 day by 37 degrees-Celsius.

After cultivating the colony which appeared, for 1 day by 37 degrees-Celsius by LB culture medium after that, the plasmid (human Fas ligand- BCMGSneo) was collected by the alkaline process.

[0041]

About this human Fas ligand- BCMGSneo1 micro-g, the gene transfer was performed by the electroporation method with respect to 1*10⁶ piece of L5178Y cells.

Conditions were performed by 296V and 960 micro-F using the gene pulser (made by a BIORAD company).

This cell was again suspended to 5 ml of 10% FCS-RPMI1640 culture mediums.

It cultivated by putting the liquid of this cell into 6well plate.

However, at this time, G418 (made by GIBCO company) was added to the culture medium so

の細胞の液を入れて培養を行つたが、この時、G 4 1 8 (G I B C O 社製) を 0.4 mg / ml になるように培地に添加した。10日間の培養後、コロニーが得られたので、限界希釈法により、細胞をクローニングした。得られたクローンについて、ノーザンハイブリダイゼーション法によりヒト F a s リガンドのm R N A の濃度が一番高いものにを選別し、培養した。これを F a s リガンド-L 5 1 7 8 Y 細胞 (すなわち、L 5 1 7 8 Y-F a s L) とした。

【0042】

(3) マウス肝細胞に対する F a s L の細胞障害性の検討

(1) 可溶性 F a s L (s F a s L) の調製
L 5 1 7 8 Y-F a s L を 75 cm² の培養フラスコを用いて 5 × 10⁵ 個 / ml の濃度で 1 0% F C S · R P M I 1 6 4 0 培地 3 0 m l で 4 日間培養し、培養上清を回収した。回収した培養上清 (s F a s L) は、0.45 μ m のフィルターで滅菌し、保存した。

(2) ターゲット細胞の調製

細胞は、(1) で調製した肝実質細胞を 1 0% F C S · L-1 5 培地にて 2 × 10⁵ 個 / ml に調製した。

【0043】

(3) アッセイ

(1) で調製した s F a s L 分子を 1 0% F C S · R P M I 1 6 4 0 培地で 1 2 倍に希釈した。96 ウェル平底プレート (コ

that it might be set to 0.4 mg/ml.

For 10 days after cultivating, since the colony was obtained, the cell was cloned with the threshold dilution method.

About the obtained clone, the concentration of mRNA of a human Fas ligand selects highness most by the Northern-hybridization method.

It cultivated.

This was made into the Fas ligand- L5178Y cell (that is, L5178 Y-FasL).

【0042】

(3)

Cytotoxic study of FasL with respect to a mouse hepatic cell

(1) Preparation of soluble FasL (sFasL)

L5178 Y-FasL will be cultivated for 4 days by 30 ml of 10% FCS* RPMI1640 culture mediums by 5*10⁵ piece/ml concentration using a 75-cm-squared culture flask.

The culture supernatant liquid was collected. The collected culture supernatant liquid (sFasL) sterilizes with the filter of 0.45 micrometer.

It preserved.

(2) The preparation cell of a target cell prepared the hepatic parenchymal cell prepared by (1) to 2*10⁵ piece/ml by 10% FCS*L-15 culture medium.

【0043】

(3) Assay

SFasL molecule prepared by (1) was diluted 12 times by 10% FCS* RPMI1640 culture medium.

Using 96 well flat bottom plate (made by Corning Incorporated), to each well this added

ニング社製)を用い、各ウェルにこの希釈液25μl加えた。次いで、10%FCS・L-1 5培地を25μl加えた。また、比較対象として、抗マウスFas抗体(Jo-2:ファーミンジョン社製)を10μg/mlの濃度で25μl加えたもの、さらにはTNF(シグマ社製)を10μg/mlで25μl加えたものを用いた。このプレートの各ウェルに50μlの(2)で調製したターゲットを入れた。その後、37℃、5%CO₂の環境下のもとで12時間インキュベートした。次いで、アラマーブルー(Alamar blue™、コスマバイオ社製)を10μl加え、さらに37℃、5%CO₂下にて4時間反応させた。その後、フロオロスキャンII(タイターテック社製)を用いて蛍光量を測定した。その結果をまとめたものを表1に示す。表1から明らかなように、肝実質細胞は、sFasLに対してのみviability(生存率)が低下した。

【0044】

dilution-liquid 25 microliter.

Subsequently, 10% FCS*L-15 culture medium was added 25 microliters.

Moreover, that which added the anti-mouse Fas antibody (Jo-2: made by Pharmingen company) 25 microliters by 10 micro-g/ml concentration, and the thing which added TNF (made in a sigma company) 25 microliters by 10 micro-g/ml were used as a comparison object.

The target prepared by (2) of 50 microliters was put into each well of this plate.

After that, it incubated for 12 hours 37 degrees-Celsius and under the environment of 5% CO₂.

Subsequently, offal multiple-independently-targetable-reentry-vehicle roux (Alamar blue™, made in a Cosmo-Bio company) is added 10 microliters. Furthermore it was made to react for 4 hours under 37 degrees-Celsius and 5% CO₂.

After that, fluorescent quantity was measured using fluoro scan II (made by a titer tech company).

That which collected the result is shown to Table 1.

As for the hepatic parenchymal cell, viability (survival rate) reduced from Table 1 only to sFasL clearly.

[0044]

【表1】

[Table 1]

添加剤	生存率 (%)
未添加	100
sFasL	0.5
抗Fas抗体	99
TNF	98

Additives	Survival rate (%)
No additives	
...	
Anti- Fas antibody	
...	

【0045】

(4) マウス肝細胞に対するFasLの細胞障害における抗ヒトFasL抗体の効果

前述のごとく、FasLは、肝実質細胞に対し、細胞障害性を示すことが分かったので、次に、この細胞障害反応が抗ヒトFasL抗体で阻害できるかどうかについて検討を加えた。すなわち、(3)と同様の系において実施した。前記(3)の(1)で調製したsFasLを10% FCS・RPMI1640培地で12倍に希釈した。96ウェル平底プレートを用い、各ウェルにこの希釈液を25μl加えた。次いで、10%FCS・L15培地にて10μg/mlに希釈した抗ヒトFasL抗体(NOK1)を25μl加え、37℃、5%CO₂下にて1時間インキュベートした。次に、肝実質細胞2×10⁵個/mlを50μl/ウェル加えた。3

[0045]

(4)

The effect of the anti-human FasL antibody in the cell damage of FasL with respect to a mouse hepatic cell

As mentioned above, it was found that FasL shows cytotoxicity with respect to a hepatic parenchymal cell. Next, study was added about the ability of this cell-damage reaction to be able to obstruct by the anti-human FasL antibody.

That is, it was performed in the system similar to (3).

SFasL prepared by (1) of above-mentioned (3) was diluted 12 times by 10% FCS*RPMI1640 culture medium.

This dilution liquid was added to each well 25 microliters using 96 well flat bottom plate.

Subsequently, the anti-human FasL antibody (NOK1) diluted to 10 micro-g/ml was added 25 microliters by 10% FCS*L15 culture medium, and 1 hour incubation was carried out under 37 degrees-Celsius and 5% CO₂.

Next, they are a 2*105 piece/ml hepatic parenchymal cell 50 micro-s / well added.

It incubated for 12 hours under 37 degrees-Celsius and 5% CO₂.

Subsequently, offal multiple-independently-

7℃、5%CO₂下にて12時間インキュベートした。次いで、アラマーブルー (Alamar blue™, made in a Cosmo-Bio company) を10μl加え、さらに37℃、5%CO₂下にて4時間インキュベートした。その後、フルオロスキャンIIを用いて、生細胞が分解した色素の蛍光強度を測定した。その結果を表2に示す。表2から明らかのように、抗FasL抗体の添加により肝細胞のアポトーシスは抑制された。

【0046】

[0046]

【表2】

[Table 2]

添加剤	生存率 (%)
未添加	100
sFasL	0.5
sFasL + 抗FasL抗体	99
Additives	Survival rate (%)
No additives	
...	
... Anti- FasL antibody	

すなわち、in vitroの実験系では、FasLを介した肝細胞のアポトーシスを、抗FasL抗体が抑制できることが確認できた。

That is, in the experiment system of vitro, it has confirmed that an anti- FasL antibody could suppress apoptosis of the hepatic cell through FasL.

【0047】

(5) SCIDマウスにおける実験的肝炎モデル系における抗FasL抗体投与による肝炎の抑制の検討

SCIDマウス（8週齢のメス、チャルーズリバー社製）1匹あたり、ヒトの末梢血単核細胞（PBMC）を 5×10^7 個を1mlのPBSに懸濁したものを腹腔内に投与した。次いで、6時間ないし12時間後にD-ガラクトサミン（ワコー社製）20mgとSEB（Staphylococcal enterotoxin B）（シグマ社製） $10 \mu\text{g}$ をPBS1mlに懸濁したものをさらに腹腔内に投与した。なお、抗FasL抗体を投与する場合は、D-ガラクトサミン、SEB投与30分前に、 $500 \mu\text{g}$ を腹腔投与した。その後、12時間後における血中のGOT（グルタミン酸-オキサロ酢酸トランスアミナーゼ）及びGPT（グルタミン酸-ピルビン酸トランスアミナーゼ）の濃度を測定するとともに、24時間後の肝細胞の染色を行った。その結果、抗FasL抗体投与群は、24時間後に、コントロールの非投与群に比べ、有意に生存が認められた。また、12時間後のGOTとGPTの量は、コントロールに比べて2桁違いの値となり、正常に近いほどに回復しているのが認められた。結果を表3に示す。

【0048】

[0047]

(5)

Study of inhibition of the hepatitis by the anti-FasL antibody administration in the experimental hepatitis model system in SCID mouse

That which suspended in 1 ml PBS 5*10⁷ piece of human's peripheral-blood mononuclear cell (PBMC) per 1 animal (a 8-week-old female, made by Charles River company) of SCID mice was administered to intraperitoneal.

Subsequently, 6 hour thru 12 hours after D-galactosamine (made in Wako company) 20 mg, and SEB (that which suspended Staphylococcal enterotoxin B)(made in sigma company) 10 micro-g to PBS1 ml furthermore, administered to the inside of an abdomen.

In addition, when administering an anti- FasL antibody, the abdominal-cavity administration of the 500 micro-g was carried out 30 minutes before D-galactosamine and SEB administration.

After that, while blood concentration of GOT (glutamic-acid-oxalacetic-acid transaminase) and GPT (glutamic-acid-pyruvic-acid transaminase) after 12 hours was measured, coloring of the hepatic cell after 24 hours was performed.

As a result, as for the anti- FasL antibody administration group, survival observed significantly 24 hours after compared with the group of control non-administering a medicine for the patient.

Moreover, the quantity of GOT and GPT after 12 hours, comparing to control, became the value with difference of 2 digits, having recovered observed so that it was normally near.

A result is shown to Table 3.

[0048]

【表 3】

[Table 3]

抗FasL抗体	生存数	GOT	GPT
+	4/4	350	210
-	0/4	>10000	>10000

Anti- FasL antibody Survival rate

この結果、本発明のヒトの F a s リガンドに対する抗体の投与は、肝炎の治療剤として有効であることが実証できた。

Consequently, it has been proved that the administration of the antibody with respect to Fas ligand of the human of this invention was effective as a therapeutic agent of a hepatitis.

【0049】

[0049]

【参考例 1】

抗FasL抗体のV領域遺伝子シーケンス

ハイブリドーマNOK 1～5を用いて、下記のプロトコールにより F a s リガンドに対するモノクローナル抗体の可変領域（V領域）の遺伝子シーケンスを行った。

1. c DNAの調製

(1) ハイブリドーマNOK 1～5のそれぞれを 2 5 c m³ フラスコ中で培養した。培養細胞を回収して、P B Sで遠心洗浄した後、1 m l のP B Sに懸濁し、細胞数を数えた。細胞 1 × 1 0⁶ 個を無菌のエッペンドルフチューブに入れ、遠心分離で上清を抜き取り、ペレットをタ

[Reference Example 1]

V region gene sequence of an anti- FasL antibody

The following protocol performed the gene sequence of the variable region (V region) of the monoclonal antibody with respect to Fas ligand using hybridoma NOK 1-5.

1. Preparation of cDNA

(1)

Each of hybridoma NOK 1-5 was cultivated in the 25 cm³ flask.

A culture cell is collected.

After carrying out centrifugal washing by PBS, it suspends to 1 ml PBS.

The number of cells was counted.

1*10⁶ piece of cells is put into a sterile Eppendorf tube.

The supernatant liquid was sampled by the centrifugation and the pellet was tapped.

(2)

RNAZO1B (made by Cosmo Bio) was added 200 microliters, it stirred by the chip of a pipet

ッピングした。

(2) R N A_{zo1} B (コスモバイオ製) を 2 0 0 μ l 加え、ピペットマンのチップでよく攪拌して細胞を溶かした。クロロホルムを 2 0 μ l 添加し、振盪後、氷中に 5 分間放置した。4 °C で 1 5, 0 0 0 r p m、1 5 分間遠心した後、上層の無色透明の部分を回収し、新しいチューブに移した。4 °C で 1 5, 0 0 0 r p m、1 5 分間遠心した後、上清を捨てて、ペレットに 7 5 % エタノールを 8 0 0 μ l 加え、- 2 0 °C で 3 0 分間放置した。4 °C で 1 5, 0 0 0 r p m、1 5 分間遠心した後、ペレットに蒸留水 1 1. 5 μ l 添加した。

(3) オリゴdT (0. 5 mg / ml) を 0. 5 μ l 添加して、7 0 °C で 1 0 分間、氷上で 5 分間放置した。

【0050】

man being sufficient, and the cell was dissolved. 20 microliter addition of chloroform is carried out.

5 minutes was left after shaking and in ice.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, the upper colorless and transparent part was collected and it moved to the new tube.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, the supernatant liquid was thrown away, the ethanol was added to the pellet 800 microliters 75%, and 30 minutes was left by -20 degrees-Celsius.

After centrifuging 15 minutes 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius, distilled-water 11.5 microliter addition was carried out at the pellet.

(3)

Oligo dT (P. 5 mg/ml) 0.5 microliter addition is carried out.

5 minutes was left by 10 minutes and the on ice by 70 degrees-Celsius.

[0050]

【表4】

[Table 4]

5 x R T b u f f e r 4 μ l

1 0 mM d N T P m i x 1 μ l

S u p e r s c r i p t R T a s e 1 μ l

(S t r a t a g e n e 製)

...

(Made by ...)

を加え、42℃で50分間、90℃で5分間、氷上で5分間放置した。

(4) RNaseHを1μl添加し、37℃で20分間放置した。このようにして、cDNA混合物を調製した。

【0051】

2. PCR反応

(1) 前記で得られたcDNAを用い、下記の条件でPCR反応を行った。

【0052】

【表5】

This is added, and it was left by 50 minutes by 42 degrees-Celsius, and 5 minutes was left by 5 minutes and the on ice by 90 degrees-Celsius.

(4)

1 microliter addition of the RNaseH is carried out.

20 minutes was left by 37 degrees-Celsius. Thus, cDNA mixture was prepared.

[0051]

2. PCR reaction

(1)

PCR reaction was performed on condition that the following using cDNA obtained by the above-mentioned.

[0052]

[Table 5]

	VH	VL
cDNA	2 μl	2 μl
dNTPmix	1 μl	1 μl
primer	2 μl	1 μl
(Pharmacia製)		
10xPCR buffer	4 μl	4 μl
DDW	30.5 μl	31.5 μl
Amp l i - Tag	0.5 μl	0.5 μl
...		
(Made by ...)		
...		

【0053】

ミネラルオイル40μlを重層し、94℃で5分間放置した後、「55℃で2分間、72℃

[0053]

Mineral-oil 40 microliter is stratified.

By 55 degrees-Celsius after leaving 5 minutes by 94 degrees-Celsius, 3 minutes was

で3分間、94°Cで1分間」のサイクルを30サイクル行い、次いで、55°Cで2分間、72°Cで10分間放置した。

(2) 反応液4μlをミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でチェックした。結果を図1に示す。モノクローナル抗体NOK 3のL鎖を除いて、PCRによりDNA断片が増幅したことが確認された。

【0054】

3. VH及びVLフラグメントの回収

(1) 上記で調製したPCR生成物をミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)させて、VH(H鎖V領域)及びVL(L鎖V領域)のバンドをゲルから切り出した。

(2) Gene CleanでPCR生成物を回収し、ミニゲル電気泳動(1.5%アガロースゲル)でバンドをチェックした。例として、NOK 4のVHについての結果を図2に示す。

【0055】

4. ライゲーション

下記TAクローニングキットを用い、DNAの連結反応(Ligation)を行った。

【0056】

【表6】

performed by 2 minutes and 72 degrees-Celsius, 94 degrees-Celsius performed 30 cycles of the cycles of 1 minute", and 10 minutes was left by 2 minutes and 72 degrees-Celsius by 55 degrees-Celsius then.

(2)

Reaction-solution 4 microliter was checked by the mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel).

A result is shown to Figure 1.
The L chain of monoclonal-antibody NOK 3 is excluded.

It was checked that the DNA fragment had amplified by PCR.

[0054]

3. Collection of VH and VL fragment

(1)

The mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel) of the PCR product prepared by the above is carried out.

The band of VH (heavy-chain V region) and VL (L-chain V region) was cut down from the gel.

(2)

Gene PCR product is collected by Clean.

The band was checked by the mini gel electrophoresis (1.5% agarose gel).

As an example, the result about VH of NOK 4 is shown to Figure 2.

[0055]

4. Ligation

The ligation (Ligation) of DNA was performed using following TA cloning kit.

[0056]

[Table 6]

ADDW	5 μ l
10x Ligation buffer	1 μ l
PCRベクター	2 μ l
PCR生成物	1 μ l
T4 DNA Ligase	1 μ l
...	
PCR Vector	
PCR product	
...	

14°Cで一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

Night reaction was performed by 14 degrees-Celsius, and the ligation mixture was obtained.

【0057】

5. トランスフォーメイション
TAクローニングキットを用いて形質転換 (Transformation)を行った。

(1) 氷上で細胞 50 μ l に、0.5 M の β メルカプトエタノール 2 μ l、及び前記で調製したライゲーション混合物を添加し 30 分間放置した後、42°C の湯浴中に 30 秒間、次いで、氷上に 20 分間放置した。45 0 μ l の SOC 培地を加え、37°C で 1 時間 (225 rpm) インキュベートした。

(2) 次いで、LB agar プレート (+Amp, X-Gal, IPTG) に拡散した。各サンプルは、50 μ l、100 μ l、200 μ l であった。37°C で 18 時間インキュベートした後、4°C で 2 時間放置したところ、白と青のコロニーが発現した。

[0057]

5. It transformed using the transformation TA cloning kit (Transformation).

(1)

After having added mercaptoethanol (beta) 2 microliter of 0.5M, and the ligation mixture prepared by the above-mentioned to cell 50 microliter and leaving 30 minutes in it by the on ice, 20 minutes was left then for 30 seconds in 42 degrees-Celsius water bath at the on ice.

SOC culture medium of 450 microliters was added and 1 hour (225 rpm) incubation was carried out by 37 degrees-Celsius.

(2)

Subsequently, LB It diffused on agar plate (+Amp, X-Gal and IPTG).

Each sample was 50 microliter, 100 microliter, and 200 microliter.

After incubating for 18 hours by 37 degrees-Celsius, when it was left for 2 hours by 4 degrees-Celsius, the colony of white and blue expressed.

【0058】

6. ミニ培養 (M i n i C u l t u r e)

(1) 前記各サンプルのプレートから白いコロニーを4個ずつ拾った。

(2) 3 ml のLB培地 (+Amp) に1個のコロニーを加え、37°Cで一晩振盪した。

【0059】

7. ミニ調製 (M i n i P r e p a r a t i o n)

(1) 培養溶液1. 5 ml をエッペンドルフチューブに取った。(保存用としてLBプレートに拡散して37°Cで培養した。) 4°Cで6, 000 rpm、2分間遠心した。

(2) ppt. + 100 μl 溶液1 (リゾチーム 5 mg/ml) を加え、室温で5分間放置した後、200 μl の溶液2 (氷上で穏やかに5分間混合) を添加し、150 μl の溶液3 (氷上で15分間混合) を添加し、次いで、4°Cで12, 000 rpm、5分間遠心した。

(3) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のフェノールを添加し、次いで、室温で12, 000 rpm、1分間遠心した。

【0060】

(4) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、等容量のCHCl₃:iAA (99:1) 混合物を加え、室温で12, 000 rpm、1分間遠心した。

[0058]

6. Mini-culture (Mini Culture)

(1)

It gathered the 4-piece white colony respectively from the plate of each above-mentioned sample.

(2)

The 1-piece colony was added to 3 ml LB culture medium (+Amp), and it carried out night shaking by 37 degrees-Celsius.

[0059]

7. Mini-preparation (Mini Preparation)

(1)

1.5 ml of culture solutions was taken in the Eppendorf tube.

(for preservation, it diffused on LB plate and it cultivated by 37 degrees-Celsius)

2 minutes was centrifuged 6,000 rpm by 4 degrees-Celsius.

(2)

The ppt.+100 microliter solution 1 (lysozyme 5 mg/ml) is added, and it is room temperature, and after leaving 5 minutes, the solution 2 (5 minutes is quietly mixed by the on ice) of 200 microliter is added.

The solution 3 (15 minutes is mixed by the on ice) of 150 microliters is added.

Subsequently, 5 minutes was centrifuged 12,000 rpm by 4 degrees-Celsius.

(3)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

The phenol of equal volumes is added to this.

Subsequently, it was room temperature and 1 minute was centrifuged 12,000 rpm.

[0060]

(4)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

The CHCl₃:iAA (99:1) mixture of equal volumes is added to this, and it was room temperature and 1 minute was centrifuged 12,000 rpm.

(5) 新しいエッペンドルフチューブに上清を取った。これに、 $1 \mu l$ のMussel glycogenと $900 \mu l$ のエタノールを添加し、 -80°C で30分間放置した後、 4°C で15,000 rpm、5分間遠心した。

(6) 沈殿物を乾燥した。 $20 \mu l$ のTE及び $1 \mu l$ のRNase A (5 mg/ml) を加え、 65°C で20分間放置した。

(7) このようにして、プラスミドDNAを得た、

(8) 下記の条件でミニゲル電気泳動を行い、バンドをチェックした。NOK 4 VL、NOK 5 VH、NOK 5 VLの結果を図3に示す。

(5)

The supernatant liquid was taken in the new Eppendorf tube.

To this, Mussel glycogen of 1 microliter and the ethanol of 900 microliters are added.

After leaving 30 minutes by -80°C Celsius, 5 minutes was centrifuged 15,000 rpm by 4 degrees-Celsius.

(6)

The precipitate was dried.

TE of 20 microliters, and RNase of 1 microliter A (5 mg/ml) was added and 20 minutes was left by 65°C Celsius.

(7)

Thus, plasmid DNA was obtained.

(8)

The mini gel electrophoresis was performed on condition that the following, and the band was checked.

The result of NOK 4 VL, NOK 5 VH, and NOK 5 VL is shown to Figure 3.

【0061】

[0061]

【表7】

[Table 7]

H B u f.	$1 \mu l$
E c o R I	$1 \mu l$ (IU)
D N A	$1 \mu l$
A D D W	$7 \mu l$

37°C で1時間インキュベートした後、 0.75% アガロースゲルに加えて電気泳動を行った。

After carrying out 1 hour incubation by 37°C , in addition to the agarose gel, the electrophoresis was performed 0.75% .

【0062】

8. DNAシーケンス

(1) プラスミドNDAを 1μ 1とり、99 μ lのTEにて希釈した。

(2) A260を測定し、DNA値を計算した(A260 $\times 1.0 = 50\mu\text{g}/\text{ml}$)。

(3) A260値より、DNAが $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ となるようにTEにて希釈した。

(4) Dye terminator法により、DNAシーケンス(ABIモデル373A)を行った。

[0062]

8. DNA sequence

(1)

The plasmid NDA was taken 1 microliter and it diluted by TE of 99 microliter.

(2)

A260 is measured.

The DNA value was calculated (A260 of $1.0 = 50\text{ micro-g/ml}$).

(3)

From A260 value, DNA diluted by TE so as to become $1\text{ micro-s g}/\text{microliter}$.

(4)

By Dye terminator method, it is the DNA sequence (ABI model 373 A) was performed).

【0063】

9. V領域の解析

このようにして得られたDNAシーケンスをもとに、V領域のアミノ酸配列をコンピュータ解析により求めた。結果を図4(モノクローナル抗体NOK 1~5のVH領域のアミノ酸配列)、及び図5(モノクローナル抗体NOK 1、2、4、5のVL領域のアミノ酸配列)に示す。これらの図において、四角の線で囲った箇所は、超可変領域(CDR 1~3)である。

[0063]

9. Analysis of V region

Thus on the basis of the obtained DNA sequence, it calculated for the amino acid sequence of V region in the computer analysis.

A result is shown to Figure 4 (amino acid sequence of VH region of monoclonal-antibody NOK 1-5), and 5 (amino acid sequence of VL region of monoclonal-antibody NOK 1, 2, 4, and 5).

These figures.

WHEREIN, the part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

【0064】

[0064]

【発明の効果】

以上説明したように、本発明の肝炎治療剤は、肝炎治療に有用である。とりわけ、本発明の肝炎治療剤は、肝実質細胞がアポトーシスにより死ぬことにより発症する肝炎に有効となる。その理由は、本発明の肝炎治療剤

[EFFECT OF THE INVENTION]

As explained above, the hepatitis therapeutic agent of this invention is useful to the hepatitis treatment.

Especially, the hepatitis therapeutic agent of this invention consists the hepatitis developed when a hepatic parenchymal cell dies by apoptosis with effectiveness.

As for the reason, the hepatitis therapeutic

は、FasLとFasを介した肝実質細胞のアポトーシスを抑制するからである。

agent of this invention suppresses apoptosis of the hepatic parenchymal cell through FasL and Fas.

【0065】

[0065]

【配列表】

配列番号：1
 配列の長さ：120
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
 Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 Ser
 1 5
 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Ser Trp
 20
 25 30
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 Gly
 35
 40 45
 Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp
 Thr Asn Asp Asn Gly Lys Phe
 Lys
 50 55
 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp
 Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met
 65 70
 75 80
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala
 85
 90 95
 Arg Ser Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser
 Pro Trp Phe Thr Tyr Trp Gly Gln
 100
 105 110
 115 120

[Sequence table]

Sequence number: 1
 Length of a sequence: 120
 Sequence-type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 ValGlnLeuGlnGluSerGlyProGluLeuValLysProGlyAlaSer
 1 5 10
 15
 5 ValLysIleSerCysLysAlaSerGlyTyrAlaPheSerSerTrp
 20 25
 30
 MetAsnTrpValLysGlnArgProGlyLysGlyLeuGluTrpIleGly
 35 40
 45
 ArgIleTyrProGlyAspGlyAspThrAsnAspAsnGlyLysPheLys
 50 55
 60
 GlyLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyrMet
 65 70
 75 80
 GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrPheCysAla
 85 90 95
 ArgSerTyrTyrTyrAspGlySerProTrpPheThrTyrTrpGlyGln
 100 105
 110
 GlyThrThrValThrValSerSer
 115 120

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
120

【0066】

配列番号: 2

配列の長さ: 360

配列の型: 核酸

鎖の数: 二本鎖

トポロジー: 直鎖状

配列の種類: c D N A t o
m R N A

起源

マウス

配列の特徴:

特徴を決定した方法: E

配列

GTG CAG CTG CAG GAG TCT
GGA CCT GAG CTG GTG
AAG CCT GGG GCC TCA
48
GTG AAG ATT TCC TGC AAG
GCT TCT GGC TAT GCA TTC
AGT AGC TCC TGG 96
ATG AAC TGG GTG AAG CAG
AGG CCT GGA AAG GGT CTT
GAG TGG ATT GGA 144
CGA ATT TAT CCT GGA GAT
GGA GAT ACT AAC GAC AAC
GGG AAG TTC AAG 192
GGC AAG GCC ACA CTG
ACC GCA GAC AAA TCC TCC
AGC ACA GCC TAC ATG
240
CAA CTC AGC AGT CTG ACA
TCT GAG GAC TCT GCG GTC
TAC TTC TGT GCA 288
AGA TCG TAT TAC TAC GAT
GGT AGC CCC TGG TTT ACT
TAC TGG GGC CAA 336
GGG ACC ACG GTC ACC
GTC TCC TCA
360

[0066]

Sequence number: 2

Length of a sequence: 360

Sequence type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence:

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCT
GGTGAAGCCTGGGGCCTCA 48
GTGAAGATTCTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAT
GCATTCAGTAGCTCTGG 96
ATGAACGGGTGAAGCAGAGGCCTGGAAA
GGGTCTTGAGTGGATTGGA 144
CGAATTATCCTGGAGATGGAGATACTAACG
ACAACGGGAAGTTCAAG 192
GGCAAGGCCACACTGACCGCAGACAAATC
CTCCAGCACAGCCTACATG 240
CAACTCAGCAGTCTGACATCTGAGGACTCT
GCGGTCTACTTCTGTGCA 288
AGATCGTATTACTACGATGGTAGCCCCCTGGT
TTACTTACTGGGGCAA 336
GGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA
360

【0067】

[0067]

配列番号 : 3
配列の長さ : 108
配列の型 : アミノ酸
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : ペプチド
配列
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro
Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
Gly
1 5
10 15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg
Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20
25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu
Leu Ile
35
40 45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser
Gly
50 55
60
65 70
75 80
85 90
95
100 105
105
100

Sequence number: 3
Length of a sequence: 108
Sequence-type: Amino acid
Topology: Linear
Kind of sequence: Peptide
Sequence
AspIleGlnMetThrGlnSerProSerSerLeuSerAlaS
erLeuGly
1 5 10
15
5 AspArgValThrIleSerCysArgAlaSerGlnAspIleSer
AsnTyr
20 25
30
35 40
45
50 55
60
65 70
75 80
85 90
95
100 105
105
100

【0068】
配列番号 : 4
配列の長さ : 324
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 二本鎖
トポロジー : 直鎖状

[0068]
Sequence number: 4
Length of a sequence: 324
Sequence-type: Nucleic acid
The number of chains: It is double stranded.
Topology: Linear
Kind of sequence: cDNA to mRNA

配列の種類 : c D N A t o Origin
 m R N A Mouse
 起源
 マウス
 配列の特徴 :
 特徴を決定した方法 : E
 配列
 GAC ATC CAG ATG ACG CAG
 TCT CCA TCC TCC CTG TCT
 GCC TCT CTG GGA 48
 GAC AGA GTC ACC ATC AGT
 TGC AGG GCA AGT CAG GAT
 ATT AGC AAT TAT 96
 TTA AAC TGG TAT CAG CAG
 AAA CCA GAT GGA ACT GTT
 AAA CTC CTG ATC 144
 TAC TAC ACA TCA AGA TTA
 CAC TCA GGA GTC CCA TCA
 AGG TTC AGT GGC 192
 AGT GGG TCT GGG ACA GAT
 TAT TCT CTC ACC ATC AGC
 AAC CTG GAA CCT 240
 GAA GAT ATT GCC ACT TAC
 TTT TGT CAG CAA TAT AGT
 GAA TTT CCG TGG 288
 ACG TTC GGT GGA GGC
 ACC AAG CTG GAA ATC AAA
 CGG 324

The characteristic of a sequence :
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GACATCCAGATGACGCAGTCTCCATCCTCC
 CTGTCTGCCTCTGGGA 48
 GACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAGT
 CAGGATATTAGCAATTAT 96
 TTAAACTGGTATCAGCAGAAACCAGATGGAA
 CTGTTAAACTCCTGATC 144
 TACTACACATCAAGATTACACTCAGGAGTCC
 CATCAAGGTTCAAGTGGC 192
 AGTGGGTCTGGGACAGATTATTCTCTCACC
 ATCAGCAACCTGGAACCT 240
 GAAGATATTGCCACTTACTTTGTCAGCAAT
 ATAGTGAATTCCGTGG 288
 ACGTTGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
 CAAACGG 324

【0069】
 配列番号 : 5
 配列の長さ : 118
 配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列
 Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala
 Glu Leu Val Arg Pro Gly Thr Ser
 1 5 10
 10 15 15
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ala
 Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
 20 30 20
 25 30 30
 Ile Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro

[0069]
 Sequence number: 5
 Length of a sequence: 118
 Sequence type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 ValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuValArgProGlyThrSer
 1 5 10
 10 15 15
 ValLysMetSerCysLysAlaAlaGlyTyrThrPheThrAsnTyrTrp
 20 25 20
 25 30 30
 IleGlyTrpValLysGlnArgProGlyHisGlyLeuGluTrpIleGly

Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly	35	40	
35	45		
40	45	TyrLeuTyrProGlyGlyLeuTyrThrAsnTyrAsnGluLy	
Tyr Leu Tyr Pro Gly Gly Leu Tyr		sPheLys	
Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	50	55	
Lys	60		
50	55	GlyLysAlaThrLeuThrAlaAspThrSerSerSerThrAl	
60		aTyrMet	
Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp	65	70	
Thr Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met	75	80	
65	70	GlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlalleTyrTy	
75	80	rCysAla	
Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser	85	90	95
Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys			ArgTyrArgAspTyrAspTyrAlaMetAspTyrTrpGlyG
Ala			nGlyThr
	85	100	105
90	95	110	
Arg Tyr Arg Asp Tyr Asp Tyr Ala			ThrValThrValSerSer
Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr	115		
100			
105	110		
Thr Val Thr Val Ser Ser			
115			

【0070】

配列番号：6

配列の長さ：354

配列の型：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：cDNA to mRNA

mRNA

起源

マウス

配列の特徴：

特徴を決定した方法：E

配列

GTG CAG CTG CAG CAG TCA

GGA GCT GAG CTG GTA

AGG CCT GGG ACT TCA

48

GTG AAG ATG TCC TGC AAG

GCT GCT GGA TAC ACC TTC

ACT AAC TAC TGG 96

ATA GGT TGG GTA AAG CAG

[0070]

Sequence number: 6

Length of a sequence: 354

Sequence-type: Nucleic acid

The number of chains: It is double stranded.

Topology: Linear

Kind of sequence: cDNA to mRNA

Origin

Mouse

The characteristic of a sequence :

Method to have determined the characteristic:

E

Sequence

GTGCAGCTGCAGCAGTCAGGAGCTGAGCT

GGTAAGGCCTGGGACTTCA 48

GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTGCTGGATAC

ACCTTCACTAACTACTGG 96

ATAGGTTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAT

GGCCTTGAGTGGATTGGA 144

TATCTTACCCCTGGAGGTCTTATACTAACTA

CAATGAGAAGTTCAAG 192

GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACACATC

CTCCAGCACAGCCTACATG 240

AGG CCT GGA CAT GGC CTT	CAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCT		
GAG TGG ATT GGA	144	GCCATCTATTACTGTGCA	288
TAT CTT TAC CCT GGA GGT		AGATACAGGGATTACGACTATGCTATGGACT	
CTT TAT ACT AAC TAC AAT		ACTGGGGCCAAGGGACC	336
GAG AAG TTC AAG	192	ACGGTCACCGTCTCCTCA	
GGC AAG GCC ACA CTG ACT	354		
GCA GAC ACA TCC TCC AGC			
ACA GCC TAC ATG	240		
CAG CTC AGC AGC CTG ACA			
TCT GAG GAC TCT GCC ATC			
TAT TAC TGT GCA	288		
AGA TAC AGG GAT TAC GAC			
TAT GCT ATG GAC TAC TGG			
GGC CAA GGG ACC	336		
ACG GTC ACC GTC TCC TCA			
354			

【0071】

配列番号 : 7	Sequence number: 7		
配列の長さ : 113	Length of a sequence: 113		
配列の型 : アミノ酸	Sequence-type: Amino acid		
トポロジー : 直鎖状	Topology: Linear		
配列の種類 : ペプチド	Kind of sequence: Peptide		
配列	Sequence		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr	AspValLeuMetThrGlnThrProLeuSerLeuProValA		
Pro Leu Ser Leu Pro Val Asn Ile	snlleGly		
Gly	1	5	10
1	5		
10	15		
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys	5	AspGlnAlaSerIleSerCysLysSerThrLysSerLeuLe	
Ser Thr Lys Ser Leu Leu Asn		uAsnSer	
Ser	20	25	
20		AspGlyPheThrTyrLeuGlyTrpCysLeuGlnLysPro	
25	30	GlyGlnSer	
Asp Gly Phe Thr Tyr Leu Gly	35	40	
Trp Cys Leu Gln Lys Pro Gly	45		
Gln Ser	50	55	
35			
40	45	60	
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Val	50	AspArgPheSerGlySerGlySerGlyThrAspPheThr	
Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val	55	LeuLysIle	
Pro	65	70	
50	55	75	80
60		SerArgValGluAlaGluAspLeuGlyValTyrTyrCysPh	
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly	85	90	95

[0072]

配列番号 : 8
配列の長さ : 339
配列の型 : 核酸
鎖の数 : 二本鎖
トポロジー : 直鎖状
配列の種類 : c D N A t o
m R N A
起源
マウス
配列の特徴 :
特徴を決定した方法 : E
配列
GAT GTT TTG ATG ACC CAA
ACT CCA CTC TCT CTG CCT
GTC AAT ATT GGA 48
GAT CAA GCC TCT ATC TCT
TGC AAG TCT ACT AAG AGC
CTT CTG AAT AGT 96
GAT GGA TTC ACT TAT TTG
GGC TGG TGC CTG CAG
AAG CCA GGC CAG TCT
144
CCA CAG CTC CTA ATA TAT
TTG GTT TCT AAT CGA TTT
TCT GGA GTT CCA 192
GAC AGG TTC AGT GGT AGT
GGG TCA GGG ACA GAT TTC
ACC CTC AAG ATC 240

[0072]

Sequence number: 8
Length of a sequence: 339
Sequence type: Nucleic acid
The number of chains: It is double stranded.
Topology: Linear
Kind of sequence: cDNA to mRNA
Origin
Mouse
The characteristic of a sequence :
Method to have determined the characteristic:
E
Sequence
GATGTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCTC
TGCCTGTCAATATTGGA 48
GATCAAGCCTCTATCTCTTGCAAGTCTACTA
AGAGCCTCTGAATAGT 96
GATGGATTCACTTATTGGGCTGGTGCCTG
CAGAACGCCAGGCCAGTCT 144
CCACAGCTCTAAATATTTGGTTCTAATCG
ATTTTCTGGAGTTCCA 192
GACAGGTTCAGTGGTAGTGGGTCAAGGGAC
AGATTCACCCCTCAAGATC 240
AGCAGAGTGGAGGCTGAGGATTGGGAGT
TTATTATTGCTTCCAGAGT 288
AACTATCTCCTCTACGTTGGATCGGGGA
CCAAGCTGGAAATAAAA 336
CGG 339

AGC AGA GTG GAG GCT
 GAG GAT TTG GGA GTT TAT
 TAT TGC TTC CAG AGT
 288
 AAC TAT CTT CCT CTT ACG
 TTC GGA TCG GGG ACC
 AAG CTG GAA ATA AAA
 336
 CGG
 339

【0073】

配列番号 : 9
 配列の長さ : 116
 配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro
 Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
 Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Trp
 20 25 30
 25 30
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg
 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 Gly 35
 40 45
 Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp
 Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 Lys 50 55
 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala As
 p Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 Met 65 70
 75 80
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala 85
 90 95
 110
 115

[0073]
 Sequence number: 9
 Length of a sequence: 116
 Sequence type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5 10
 Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Trp
 20 25
 30
 Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35 40
 45
 Arg Ile Tyr Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55
 60
 Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Ser Ser Ser Thr Ala
 p Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 Met 65 70
 75 80
 Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe
 Cys Ala 85
 90 95
 110
 115

Thr Asp Gly Tyr Trp Tyr Phe
 Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 Val
 100
 105 110
 Thr Val Ser Ser
 115

【0074】

配列番号：10
 配列の長さ：348
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA to mRNA
 mRNA
 起源
 マウス
 配列の特徴：
 特徴を決定した方法：E
 配列
 GTG AAG CTG CAG GAG TCT
 GGA CCT GAG CTG GTG
 AAG CCT GGG GCC TCA
 48
 GTG AAG ATT TCC TGC AAG
 GCT TCT GGC TAT GCA TTC
 AGT AGC TCC TGG 96
 ATG AAC TGG GTG AAA CAG
 AGG CCT GGG AAG GGT
 CTT GAG TGG ATT GGA
 144
 CGG ATT TAT CCT GTA AAT
 GGA GAT ACT AAC TAC AAT
 GGG AAG TTC AAG 192
 GGC AAG GCC ACA CTG ACT
 GCA GAC AAA TCC TCC AGC
 ACA GCC TAC ATG 240
 CAA CTC AGC AGC CTG ACA
 TCT GAG GAC TCT GCG GTC
 TAC TTC TGT GCA 288
 ACC GAT GGT TAC TGG TAC
 TTC GAT GTC TGG GGC CAA
 GGG ACC ACG GTC 336
 ACC GTC TCC TCA

[0074]

Sequence number: 10
 Length of a sequence: 348
 Sequence-type: Nucleic acid
 The number of chains: It is double stranded.
 Topology: Linear
 Kind of sequence: cDNA to mRNA
 Origin
 Mouse
 The characteristic of a sequence :
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GTGAAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGAGCT
 GGTGAAGCCTGGGGCCTCA 48
 GTGAAGATTCTCTGCAAGGCTTCTGGCTAT
 GCATTCACTAGCTCCTGG 96
 ATGAACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGAA
 GGGTCTTGAGTGGATTGGA 144
 CGGATTATCCTGTAAATGGAGATACTAACTA
 CAATGGGAAGTTCAAG 192
 GGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCC
 TCCAGCACAGCCTACATG 240
 CAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCT
 GCGGTCTACTTCTGTGCA 288
 ACCGATGGTTACTGGTACTTCGATGTCTGG
 GGCCAAGGGACCACGGTC 336
 ACCGTCTCCTCA 348

【0075】

配列番号 : 1 1
 配列の長さ : 1 1 8
 配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列

Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly
 Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
 Ser
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 15
 Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val
 Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly
 Tyr
 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe
 Pro Gly Asn Lys Leu Glu Trp
 Met
 35
 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 Gly Tyr Ile Ser Tyr Asp Gly Ser
 Asn Asn Tyr Asn Pro Ser Leu
 Lys
 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 Asn Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp
 Thr Ser Lys Asn Gln Phe Phe
 Leu
 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 Lys Leu Asn Ser Val Thr Thr
 Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
 Ala
 85 90 95 100 105 110 115
 Val Tyr Tyr Tyr Asp Gly Ser Ser
 Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 Thr
 100
 105 110 115

[0075]

Sequence number: 11
 Length of a sequence: 118
 Sequence-type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 ValGlnLeuGlnGluSerGlyProGlyLeuValLysProS
 erGlnSer
 1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115
 5 LeuSerLeuThrCysSerValThrGlyTyrSerIleThrSer
 GlyTyr
 20 25
 TyrTrpAsnTrpIleArgGlnPheProGlyAsnLysLeuGI
 uTrpMet
 35 40
 GlyTyrIleSerTyrAspGlySerAsnAsnTyrAsnProSe
 rLeuLys
 50 55
 55
 60
 AsnArgIleSerIleThrArgAspThrSerLysAsnGlnPh
 ePheLeu
 65 70
 70
 75 80
 LysLeuAsnSerValThrThrGluAspThrAlaThrTyrTy
 rCysAla
 85 90 95
 ValTyrTyrTyrAspGlySerSerPheAspTyrTrpGlyGI
 nGlyThr
 100
 105
 110
 115

【0076】

配列番号 : 12
 配列の長さ : 354
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : c D N A t o
 m R N A
 起源
 マウス
 配列の特徴 :
 特徴を決定した方法 : E
 配列
 GTG CAG CTG CAG GAG TCT
 GGA CCT GGC CTC GTG AAA
 CCT TCT CAG TCT 48
 CTG TCT CTC ACC TGC TCT
 GTC ACT GGC TAC TCC ATC
 ACC AGT GGT TAT 96
 TAC TGG AAC TGG ATC CGG
 CAG TTT CCA GGA AAC AAA
 CTG GAA TGG ATG 144
 GGC TAC ATA AGC TAC GAT
 GGT AGC AAT AAC TAC AAC
 CCA TCT CTC AAA 192
 AAT CGA ATC TCC ATC ACT
 CGT GAC ACA TCT AAG AAC
 CAG TTT TTC CTG 240
 AAG TTG AAT TCT GTG ACT
 ACT GAG GAC ACA GCC ACA
 TAT TAC TGT GCC 288
 GTT TAT TAC TAC GAT GGT
 AGC TCT TTT GAC TAC TGG
 GGC CAA GGG ACC 336
 ACG GTC ACC GTC TCC TCA
 354

【0077】

配列番号 : 13
 配列の長さ : 112
 配列の型 : アミノ酸
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : ペプチド
 配列

[0076]

Sequence number: 12
 Length of a sequence: 354
 Sequence-type: Nucleic acid
 The number of chains: It is double stranded.
 Topology: Linear
 Kind of sequence: cDNA to mRNA
 Origin
 Mouse
 The characteristic of a sequence :
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGACCTGGCCT
 CGTGAAACCTTCTCAGTCT 48
 CTGTCTCTCACCTGCTCTGTCAGTGGCTAC
 TCCATCACCAAGTGGTTAT 96
 TACTGGAACTGGATCCGGCAGTTCCAGGA
 AACAAACTGGAATGGATG 144
 GGCTACATAAGCTACGATGGTAGCAATAACT
 ACAACCCATCTCTCAA 192
 AATCGAATCTCCATCACTCGTGACACATCTA
 AGAACCAAGTTTTCTG 240
 AAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACA
 GCCACATATTACTGTGCC 288
 GTTTATTACTACGATGGTAGCTCTTGACTA
 CTGGGGCCAAGGGACC 336
 ACGGTCACCGTCTCCTCA
 354

[0077]

Sequence number: 13
 Length of a sequence: 112
 Sequence-type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro	AspIleValLeuThrGlnSerProAlaSerLeuAlaValSer	
Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Arg	LeuArg	
1	5	10
10	15	15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg	GlnArgAlaThrIleSerCysArgAlaSerGluGlyValAsp	
Ala Ser Glu Gly Val Asp Ser Tyr	SerTyr	
20	20	25
25	30	30
Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr	GlyIleSerPheMetHisTrpTyrGlnGlnLysProGlyGln	
Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro	ProPro	
Pro	35	40
35	45	45
40	45	LysLeuLeulleTyrArgAlaSerTyrLeuLysSerGlyVal
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser	ProAla	
Tyr Leu Lys Ser Gly Val Pro Ala	50	55
50	55	60
60	ArgPheSerGlySerGlySerArgThrAspPheThrLeu	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser	ThrIleAsp	
Arg Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile	65	70
Asp	75	80
65	70	ProValGluAlaAspAspAlaAlaThrTyrTyrCysGlnGlnAsnAsn
75	80	85 90 95
Pro Val Glu Ala Asp Asp Ala Ala	GluAspProTrpThrPheGlyGlyGlyThrLysLeuGlull	
Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn	eLysArg	
Asn	85 100	105
90 95	110	
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly		
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
Arg		
100		
105	110	

【0078】

配列番号 : 1 4
 配列の長さ : 3 3 6
 配列の型 : 核酸
 鎖の数 : 二本鎖
 トポロジー : 直鎖状
 配列の種類 : c D N A t o
 m R N A
 起源
 マウス
 配列の特徴 :
 特徴を決定した方法 : E

[0078]

Sequence number: 14
 Length of a sequence: 336
 Sequence-type: Nucleic acid
 The number of chains: It is double stranded.
 Topology: Linear
 Kind of sequence: cDNA to mRNA
 Origin
 Mouse
 The characteristic of a sequence :
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTT

配列	TGGCTGTGTCTCTAAGG	48
GAC ATT GTG CTG ACC CAA	CAGAGGGCCACCATATCCTGCAGAGCCAGT	
TCT CCA GCT TCT TTG GCT	GAAGGTGTTGATAGTTAT	96
GTG TCT CTA AGG	GGCATTAGTTTATGCAC TG GT ACCA CGA	
48	AACCAGGACAGCCACCC	144
CAG AGG GCC ACC ATA TCC	AAACTCCTCATCTATCGTCATCCTACCTAA	
TGC AGA GCC AGT GAA GGT	AATCTGGGGTCCCTGCC	192
GTT GAT AGT TAT	AGGTTCA GTGGTAGTGGTCTAGGACAGAC	
96	TTCACCCCTCACCA TTGAT	240
GGC ATT AGT TTT ATG CAC	CCTGTGGAGGCTGATGATGCTGCAACCTAT	
TGG TAC CAG CAG AAA CCA	TACTGTCAGCAAATAAT	288
GGA CAG CCA CCC	GAGGATCCGTGGACGTTCGTGGAGGCAC	
144	CAAGCTGGAAATCAAACGG	336
AAA CTC CTC ATC TAT CGT		
GCA TCC TAC CTA AAA TCT		
GGG GTC CCT GCC		
192		
AGG TTC AGT GGT AGT GGG		
TCT AGG ACA GAC TTC ACC		
CTC ACC ATT GAT		240
CCT GTG GAG GCT GAT GAT		
GCT GCA ACC TAT TAC TGT		
CAG CAA AAT AAT		288
GAG GAT CCG TGG ACG TTC		
GGT GGA GGC ACC AAG		
CTG GAA ATC AAA CGG		
336		

【0079】

配列番号：15
 配列の長さ：117
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列
 Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Ala
 Glu Pro Ala Lys Pro Gly Ala Ser
 1 5
 10 15
 Val Lys Met Ser Cys Lys Ala
 Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 Trp
 20
 25 30
 Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro
 Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 35
 40 45
 Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr
 Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe

[0079]

Sequence number: 15
 Length of a sequence: 117
 Sequence-type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 ValGlnLeuGlnGluSerGlyAlaGluProAlaLysProGlyAlaSer
 1 5 10
 15
 ValLysMetSerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrThrTyrTrp
 20 25
 30
 MetHisTrpValLysGlnArgProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGly
 35 40
 45
 TyrIleAsnProSerSerGlyTyrThrGluTyrAsnGlnLysPheLys
 50 55
 60

Lys		AspLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAl
50	55	aTyrMet
60	65	70
Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala	75	80
Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr	GlnLeulleSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyr	
Met	CysAla	
65	70	85 90 95
75 80	ArgArgGlyAsnTyrTyrTyrPheAspTyrTrpGlyGlnGlyThrThr	
Gln Leu Ile Ser Leu Thr Ser Glu	100	105
Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	110	
85		
90 95	ValThrValSerSer	
Arg Arg Gly Asn Tyr Tyr Tyr Phe	115	
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr		
100		
105	110	
Val Thr Val Ser Ser		
115		

【0080】

配列番号: 16
 配列の長さ: 351
 配列の型: 核酸
 鎖の数: 二本鎖
 トポロジー: 直鎖状
 配列の種類: cDNA to mRNA
 mRNA
 起源
 マウス
 配列の特徴:
 特徴を決定した方法: E
 配列
 GTG CAG CTG CAG GAG TCT
 GGG GCT GAA CCG GCA
 AAA CCT GGG GCC TCA
 48
 GTG AAG ATG TCC TGC AAG
 GCT TCT GGC TAC ACC TTT
 ACT ACC TAC TGG 96
 ATG CAC TGG GTA AAA CAG
 AGG CCT GGA CAG GGT
 CTG GAA TGG ATT GGA
 144
 TAC ATT AAT CCT AGC AGT
 GGT TAT ACT GAG TAC AAT

[0080]

Sequence number: 16
 Length of a sequence: 351
 Sequence-type: Nucleic acid
 The number of chains: It is double stranded.
 Topology: Linear
 Kind of sequence: cDNA to mRNA
 Origin
 Mouse
 The characteristic of a sequence:
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GTGCAGCTGCAGGAGTCTGGGGCTGAACC
 GGCAAAACCTGGGGCCTCA 48
 GTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTAC
 ACCTTTACTACCTACTGG 96
 ATGCACTGGGTAAAACAGAGGCCCTGGACAG
 GGTCTGGAATGGATTGGA 144
 TACATTAATCCTAGCAGTGGTTATACTGAGTA
 CAATCAGAAGTTCAAG 192
 GACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCC
 TCCAGCACAGCCTACATG 240
 CAACTAATCAGCCTGACATCTGAGGACTCT
 GCAGTCTATTACTGTGCA 288
 AGAAGGGTAATTACTACTACTTTGACTACT
 GGGGCCAAGGGACCACG 336
 GTCACCGTCTCCTCA 351

CAG AAG TTC AAG 192
 GAC AAG GCC ACA TTG ACT
 GCA GAC AAA TCC TCC AGC
 ACA GCC TAC ATG 240
 CAA CTA ATC AGC CTG ACA
 TCT GAG GAC TCT GCA GTC
 TAT TAC TGT GCA 288
 AGA AGG GGT AAT TAC TAC
 TAC TTT GAC TAC TGG GGC
 CAA GGG ACC ACG 336
 GTC ACC GTC TCC TCA
 351

【0081】

配列番号：17
 配列の長さ：105
 配列の型：アミノ酸
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：ペプチド
 配列

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr
 Pro Lys Phe Leu Pro Val Ser 1 5 10
 Ala Gly 15
 1 5 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Gl
 10 15 y Asn Asn 20 25
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys 20
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn 30
 Asn 35 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Le
 20 30 u Leu Ile 40
 25 30 35 40
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile 35 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Ph
 40 45 e Thr Gly 50 55
 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr 60
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr 65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser V
 Gly 50 55 65 70 al Gln Val 75 80
 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe 75 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln His Tyr Ser S
 Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln 80 er Pro Tyr 85 90 95
 Val 65 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 65 70 75 80 100 105
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser

[0081]

Sequence number: 17
 Length of a sequence: 105
 Sequence-type: Amino acid
 Topology: Linear
 Kind of sequence: Peptide
 Sequence
 AspValLeuMetThrGlnThrProLysPheLeuProValS
 erAlaGly
 1 5 10
 15
 1 5 AspArgValThrMetThrCysLysAlaSerGlnSerValGl
 10 15 yAsnAsn 20 25
 Asp Arg Val Thr Met Thr Cys 20
 Lys Ala Ser Gln Ser Val Gly Asn 30
 Asn 35 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Le
 20 30 u Leu Ile 40
 25 30 35 40
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro 45
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile 35 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Ph
 40 45 e Thr Gly 50 55
 Tyr Tyr Thr Ser Asn Arg Tyr Thr 60
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr 65 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser V
 Gly 50 55 65 70 al Gln Val 75 80
 60 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser S
 Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln 80 er Pro Tyr 85 90 95
 Val 65 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
 65 70 75 80 100 105
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe
 Cys Gln Gln His Tyr Ser Ser

Pro Tyr
 85
 90 95
 Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys
 Leu Glu
 100
 105

【0082】

配列番号：18
 配列の長さ：315
 配列の型：核酸
 鎖の数：二本鎖
 トポロジー：直鎖状
 配列の種類：cDNA to mRNA
 mRNA
 起源
 マウス
 配列の特徴：
 特徴を決定した方法：E
 配列
 GAT GTT TTG ATG ACC CAA
 ACT CCA AAA TTC CTG CCT
 GTA TCA GCA GGA 48
 GAC AGG GTT ACC ATG ACC
 TGC AAG GCC AGT CAG AGT
 GTG GGT AAT AAT 96
 GTG GCC TGG TAC CAA CAG
 AAG CCA GGA CAG TCT CCT
 AAA CTG CTG ATA 144
 TAC TAT ACA TCC AAT CGC
 TAC ACT GGA GTC CCT GAT
 CGC TTC ACT GGC 192
 AGT GGA TCT GGG ACA GAT
 TTC ACT TTC ACC ATC AGC
 AGT GTG CAG GTT 240
 GAA GAC CTG GCA GTT TAT
 TTC TGT CAG CAG CAT TAT
 AGC TCT CCG TAT 288
 ACG TTC GGA TCG GGG
 ACC AAG CTG GAG
 315

[0082]

Sequence number: 18
 Length of a sequence: 315
 Sequence type: Nucleic acid
 The number of chains: It is double stranded.
 Topology: Linear
 Kind of sequence: cDNA to mRNA
 Origin
 Mouse
 The characteristic of a sequence :
 Method to have determined the characteristic:
 E
 Sequence
 GATGTTTGATGACCCAACTCCAAAATTCC
 TGCCTGTATCAGCAGGA 48
 GACAGGGTTACCATGACCTGCAAGGCCAGT
 CAGAGTGTGGGTAAATAAT 96
 GTGGCCTGGTACCAACAGAACGCCAGGACA
 GTCTCCTAAACTGCTGATA 144
 TACTATACATCCAATCGCTACACTGGAGTCC
 CTGATCGCTTCACTGGC 192
 AGTGGATCTGGGACAGATTCACTTTCAACC
 ATCAGCAGTGTGCAGGTT 240
 GAAGACCTGGCAGTTATTCAGCAG
 CATTATAGCTCTCCGTAT 288
 ACGTTGGATCGGGGACCAAGCTGGAG
 315

【図面の簡単な説明】

[BRIEF EXPLANATION OF DRAWINGS]

【図 1】

図1は、抗FasL抗体のVHの遺伝子及びVLの遺伝子のPCR反応液のミニゲル電気泳動図である。

【図 2】

図2は、NOK 4のVHの遺伝子のPCR生成物のミニゲル電気泳動図である。

【図 3】

図3は、プラスミドDNAのミニゲル電気泳動図である。

【図 4】

図4は、モノクローナル抗体NOK 1～5のVH領域（H鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR 1～3）である。

【図 5】

図5は、モノクローナル抗体NOK 1、2、4、5のVL領域（L鎖）のアミノ酸配列であり、四角の線で囲った箇所は、超可変領域（CDR 1～3）である。

【図 1】**[FIGURE 1]**

Figure 1 is mini gel electropherogram of PCR reaction solution of the gene of VH of an anti-FasL antibody, and the gene of VL.

[FIGURE 2]

Figure 2 is mini gel electropherogram of PCR product of the gene of VH of NOK 4.

[FIGURE 3]

Figure 3 is mini gel electropherogram of plasmid DNA.

[FIGURE 4]

Figure 4 is the amino acid sequence of VH region (heavy chain) of monoclonal-antibody NOK 1-5.

The part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

[FIGURE 5]

Figure 5 is the amino acid sequence of VL region (L chain) of monoclonal-antibody NOK 1, 2, 4, and 5.

The part enclosed with the square line is a hypervariable region (CDR 1-3).

[FIGURE 1]



100bp	C	NOK V ₁				C	NOK V ₂					
	ON	T	1	2	3	4	ON	T	1	2	3	4
	T	R	1	2	3	4	T	R	1	2	3	4
	O	O	1	2	3	4	O	O	1	2	3	4
	L	L	1	2	3	4	L	L	1	2	3	4
	V ₁	V ₂					V ₁	V ₂				

【図 2】

[FIGURE 2]



100bp	C	ON	NOK	V ₁
	ONTROL	T	4	V ₂

【図 3】

[FIGURE 3]



1 NOK4 NOK5 NOK5
 b V₁ V₁ V₁
 p

【図 4】

[FIGURE 4]

		CDR1	CDR2	
NOK1VH . amino	1:VQLQESGPELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPGDGDTN		58
NOK2VH . amino	1:VQLQQSGAELVRPGTSVKMSCKAAGYTF	—TNYWIGWVKQRPGHGLEWIGYLYPGGLYTN		58
NOK3VH . amino	1:VKLQESGPELVKPGASVKISCKASGYAF	SSSWMNWVKQRPKGLEWIGRIYPVNGDTN		58
NOK4VH . amino	1:VQLQESGPGLVKPSQSLSLTCVTGYSITSGYYW	—NWIRQFPGNKLEWMG-YISYDGGSNN		58
NOK5VH . amino	1:VQLQESGAEPAKPGASVKMSCKASGYTF	—TTYWMHWWVKQRPQGLEWIGYINPSSGYTE		58
	* * * * * * * * * *	* * * * * * * * * *		
		CDR3		
NOK1VH . amino	59:DNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSYYDGSPW	FTYWGQGTTVT		117
NOK2VH . amino	59:YNEKFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYYCARYRDYD	—YAMDY—WGQGTTVT		115
NOK3VH . amino	59:YNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAT	—DGY—WYFDWYGQGTTVT		113
NOK4VH . amino	59:YNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCA	—VYYDG—SSFDWYGQGTTVT		115
NOK5VH . amino	59:YNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLISLTSEDSAVYYCARRGN	—YYFDY—WGQGTTVT		114
	* * * * * * * * * *	*****		
NOK1VH . amino	118:VSS			120
NOK2VH . amino	116:VSS			118
NOK3VH . amino	114:VSS			116
NOK4VH . amino	116:VSS			118
NOK5VH . amino	115:VSS			117

[图 5]

[FIGURE 5]

		CDR1	CDR2	
NOK1VL . amino	1:DIQMTQSPSSLSASLGDRVТИСRASQDИSНY—	[REDACTED]	LNWYQQKPDGTVKLLIYIYTSRLH	55
NOK2VL . amino	1:DVLMTQTPLSLPVNIGDQASISCKSTKSLNNSDGFYLCWCLQKPGQSPQLLIYLVSNRF	[REDACTED]	[REDACTED]	60
NOK4VL . amino	1:DIVLTQSPASLAVSLRQRAТИСRASEGVDSY-GISFMWYQQKPGQPPKLLIYRASYLK	[REDACTED]	[REDACTED]	59
NOK5VL . amino	1:DVLMTQTPKFLPVSAGDRVТМTCASQS-V—G-NNVAWYQQKPGQSPKLLIYIYTSNRY	[REDACTED]	[REDACTED]	55
	* * * *	*	* ***	*** * *
		CDR3		
NOK1VL . amino	56:SGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYFC	[REDACTED]	QQYSEFPWTFGGGTKEIKR	108
NOK2VL . amino	61:SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQSNY-LPLTFGSGTKLEIKR	[REDACTED]	[REDACTED]	113
NOK4VL . amino	60:SGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYC	[REDACTED]	QQNNEDPWTFGGGTKEIKR	112
NOK5VL . amino	56:TGVPDRFTGSGSGTDFTTISSVQVEDLAVYFC	[REDACTED]	QQHYSSPYTFGSGTKLE---	105
	*** * * * * *	*	* * * *	* *** * * * *

DERWENT TERMS AND CONDITIONS

Derwent shall not in any circumstances be liable or responsible for the completeness or accuracy of any Derwent translation and will not be liable for any direct, indirect, consequential or economic loss or loss of profit resulting directly or indirectly from the use of any translation by any customer.

Derwent Information Ltd. is part of The Thomson Corporation

Please visit our home page:

"WWW.DERWENT.CO.UK" (English)
"WWW.DERWENT.CO.JP" (Japanese)